

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Gerda Raja

**Replikatiivse helikaasikompleksi MCM2-7 subühikute taseme reguleerimine  
oksüdatiivse stressi sensorvalk KEAP1 poolt**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Geenitehnoloogia

Juhendaja vanemteadur Ivar Ilves, PhD

TARTU 2016

## **Replikatiivse helikaasikompleksi MCM2-7 subühikute taseme reguleerimine oksüdatiivse stressi sensorvalk KEAP1 poolt**

Replikatiivne helikaasikompleks MCM2-7 omab väga olulist rolli DNA replikatsiooni initsiatsioonis ja selle regulatsioonis. Oksüdatiivse stressi sensorvalk KEAP1 interakteerub helikaasi subühikutega MCM3 ja MCM7, kuid selle interaktsiooni roll rakus ei ole teada. Saamaks teada, kas KEAP1 osaleb selle interaktsiooni kaudu MCM2-7 kompleksi taseme regulatsioonis, viidi läbi kotransfektsiooni katsed KEAP1 valku ja MCM subühikuid ekspresseerivate plasmiididega. Selle töö tulemusena leiti, et kõikide MCM2-7 subühikute taset reguleeritakse metsiktüüpi KEAP1 poolt, kuigi selle protsessi sõltuvus KEAP1 otsesest interaktsioonist MCM3 ja 7 subühikutega vajab täiendavaid uuringuid.

**Märksõnad:** replikatsiooni initsiatsioon, MCM2-7, KEAP1.

CERCS B200 Tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia

## **The regulation of protein levels of replicative helicase complex MCM2-7 subunits by oxidative stress response protein KEAP1**

Replicative helicase complex MCM2-7 has an essential role in DNA replication initiation and its regulation. Oxidative stress response protein KEAP1 interacts with helicase subunits MCM3 and MCM7, but the role of this interaction in cells is not known. To find out if KEAP1 takes part in the regulation of protein levels of the MCM2-7 subunits by this interaction, a series of cotransfection experiments were carried out.

The results of these experiments show that the level of all MCM2-7 subunits is downregulated by a wild type KEAP1 co-expression, albeit the dependence of this process on direct interaction of KEAP1 with MCM3 and 7 subunits remains to be proved.

**Keywords:** replication initiation, MCM2-7, KEAP1.

CERCS B200 Cytology, oncology, cancerology

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 DNA replikatsiooni initsiatsioon .....	7
1.1.1 Replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine .....	7
1.1.2 Helikaasi aktiveerimine .....	8
1.1.3 Replikatsiooni initsiatsiooni regulatsioon .....	9
1.1.4 Replikatiivse helikaasi mootorvalkude kompleks MCM2-7 .....	10
1.2 Oksüdatiivse stressi vastusrada KEAP1-NRF2 .....	12
1.2.1 Helikaasi MCM2-7 subühikud interakteeruvad KEAP1-ga.....	13
2 EKSPERIMENTAALOSA .....	15
2.1 Töö eesmärgid.....	15
2.2 Materjal ja metoodika .....	15
2.2.1 Ekspressioonivektorid ja nende kloonimine.....	15
2.2.2 Kasutatud rakuliinid .....	19
2.2.3 Transfektsioon .....	20
2.2.4 Rakkude kogumine voolutustsütomeetria analüüsiks .....	20
2.2.5 Western blot analüüs .....	21
2.3 Tulemused ja arutelu.....	22
2.3.1 Katseteks sobiva rakuliini valimine.....	22
2.3.2 Transfektsioonides kasutatava plasmiidse DNA koguse optimeerimine .....	23
2.3.3 Transfektsioonireagendi valik .....	25
2.3.4 Replikaasikompleksi MCM2-7 subühikute taset reguleeritakse KEAP1 poolt..	29
2.3.5 Pole kindel, kas KEAP1 efekt MCM2 tasemele on vahendatud MCM3 või mõne teise faktori poolt.....	31
KOKKUVÕTE .....	35
SUMMARY .....	36

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU .....	37
TÄNUAVALDUSED.....	43
LIHTLITSENTS.....	44

## KASUTATUD LÜHENDID

AAA+	<i><u>A</u>TPases <u>a</u>ssociated with diverse cellular <u>a</u>ctivities</i>
BSA	<i><u>b</u>ovine <u>s</u>erum <u>a</u>lbumin</i>
Cdc45	<i><u>c</u>ell <u>d</u>ivision <u>c</u>ycle 45</i>
Cdc6	<i><u>c</u>ell <u>d</u>ivision <u>c</u>ycle 6</i>
Cdt1	<i><u>c</u>ell division cycle 10-<u>d</u>ependent <u>t</u>ranscript <u>1</u></i>
CMG	<i><u>C</u>dc-45, <u>M</u>CM2-7 ja <u>G</u>INS valgukompleks</i>
DDK	<i><u>D</u>bd7 <u>d</u>ependent <u>k</u>inase</i>
DMEM	<i><u>D</u>ulbecco's <u>m</u>odified <u>e</u>agle's <u>m</u>eedium</i>
GINS	<i><u>G</u>o-<u>I</u>chi-<u>N</u>i-<u>S</u>an jaapani keeles 5, 1, 2, 3, tähistamaks subühikuid Sld5-Psf1-Psf2-Psf3</i>
H2I	<i><u>h</u>elix-<u>2</u>-<u>i</u>nsertion</i>
HaCaT	<i>inimese nahast eraldatud keratinotsüüdid</i>
HEK	<i><u>h</u>uman <u>e</u>mbryonic <u>k</u>idney 293 cells</i>
HeLa	<i><u>H</u>enrietta <u>L</u>acks cell line</i>
HPEK	<i><u>h</u>uman <u>p</u>rimary <u>e</u>pidermal <u>k</u>eratinocytes</i>
IVR	<i><u>i</u>nterv<u>e</u>ning <u>r</u>egion</i>
KEAP1	<i><u>K</u>elch-like <u>E</u>CH-<u>a</u>ssociated <u>p</u>rotein <u>1</u>, kus ECH tähistab <u>e</u>rythroid cell-derived protein with <u>C</u>NC <u>h</u>omology</i>
MCM2-7	<i><u>m</u>inichromosome <u>m</u>aintenance complex <u>2</u>-<u>7</u></i>
MEF	<i><u>m</u>ouse <u>e</u>mbryonic <u>f</u>ibroblasts</i>
NRF2	<i><u>N</u>FE2 (nuclear factor erythroid 2) <u>r</u>elated <u>f</u>actor 2</i>
ORC	<i><u>o</u>rig<u>i</u>n-<u>r</u>ecognition <u>c</u>omplex</i>
Pre-IC	<i><u>p</u>re-<u>i</u>nitation <u>c</u>omplex</i>
Pre-RC	<i><u>p</u>re-<u>r</u>eplication <u>c</u>omplex</i>
PS1	<i><u>p</u>re-<u>s</u>ensor <u>1</u></i>
Sld	<i><u>s</u>ynthetically <u>l</u>ethal with <u>d</u>pb11-1</i>
U2OS	<i>inimese sääreluu osteosarkoomist eraldatud rakud</i>

## SISSEJUHATUS

DNA replikatsioon võib iga rakutsükli jooksul kogu genoomi ulatuses toimuda ainult ühe korra, et tagada genoomi korrektne pärandumine ning vältida võimalikke kasvajate tekkeni viivaid kahjustusi (Schimke *et al.*, 1986; Truong ja Wu, 2011). Replikatsioon on eukarüootides rangelt reguleeritud ja see regulatsioon toimub suuresti initsiatsiooni tasemel (Bell ja Stillman, 1992; Tye, 1999). DNA replikatsiooni initsiatsioon on jagatud kahte ajaliselt eraldatud etappi ning nendes osalevad mitmed kontroll- ja abifaktorid. Initsiatsioon algab M faasi lõpus ja G<sub>1</sub> faasis replikatsiooni alguspunktide litsentseerimisega, mil replikatsiooni alguspunktidesse laetakse kaks inaktiivset MCM2-7 helikaasi (Remus *et al.*, 2009). S faasis toimub helikaasi aktiveerimine (ingl *origin firing*) (Yekezare *et al.*, 2013), mille käigus moodustub aktiivne replikatiivne helikaas CMG (Aparicio *et al.*, 1997) ja algab replikatsioon.

Käesolevas töös vaadeldi, kas helikaasi MCM2-7 kompleksi subühikute taset reguleeritakse oksüdatiivse stressi sensorvalk KEAP1 poolt. KEAP1 dimeer interakteerub oma kõige paremini kirjeldatud interaktsioonipartneri NRF2-ga selle ETGE ja DLG motiivide kaudu (Ogura *et al.*, 2010) ning selline seondumine reguleerib NRF2 valgu taset läbi järgneva ubiquitinüleerimise ja sellest sõltuva proteolüüsi 26S proteasoomis. KEAP1 interakteerub ka replikatiivse helikaasikompleksi subühikute MCM3 (Ilves, publitseerimata andmed; Hast *et al.*, 2013) ja MCM7-ga (Ilves, publitseerimata andmed) vastavalt nende ETGE ja VSGE motiivide kaudu, ning selle interaktsiooni roll rakus ei ole teada. KEAP1 interakteerumine MCM3 ja MCM7-ga viitab võimalusele, et KEAP1 osaleb oksüdatiivse stressi korral ka replikatsiooni regulatsioonis.

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida, kas KEAP1 reguleerib MCM3 ja MCM7 valkude taset ja kas nende subühikute kaudu võib käia ka teiste MCM2-7 kompleksi subühikute taseme regulatsioon. Töö valmis Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis Ivar Ilvese uurimisrühmas.

Märksõnad: replikatsiooni initsiatsioon, MCM2-7, KEAP1.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 DNA replikatsiooni initsiatsioon

Iga rakutsükli jooksul võib DNA replikatsioon kogu genoomi ulatuses toimuda ainult ühe korra, et vältida DNA kahjustusi, muutusi geenide koopiarvust ja polüploidisuse teket, mis kõik võivad viia kasvaja tekkeni (Schimke *et al.*, 1986; Truong ja Wu, 2011). Replikatsiooni regulatsioon toimub suuresti initsiatsiooni tasemel (Bell ja Stillman, 1992; Tye, 1999). Eukarüootides initsieeritakse DNA süntees paljudest replikatsiooni alguspunktidest (ingl *origin*), et kogu protsess oleks kiire. Tagamaks ka täpsust, on DNA replikatsiooni initsiatsioon jagatud kahte ajaliselt eraldatud etappi: replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine ja helikaasi aktiveerimine (ingl *origin firing*) (Yekezare *et al.*, 2013).

### 1.1.1 Replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine

Replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine kujutab endast kõikidesse potentsiaalsetesse replikatsiooni alguspunktidesse replikatiivse helikaasi mootorvalkude kompleksi MCM2-7 laadimist kaksikheksameerina. Selles osalevad replikatsiooni alguspunkte äratundev kompleks (ORC, ingl *origin recognition complex*) ning valgud Cdc6 (ingl *cell division cycle 6*) ja Cdt1 (ingl *cell division cycle 10-dependent transcript 1*). Nimetatud faktoreid koos nende abil kaheaahelalisele DNA-le (dsDNA, ingl *double stranded DNA*) laetud MCM2-7 kompleksiga nimetatakse pre-replikatiivseks kompleksiks (pre-RC, ingl *pre-replicative complex*) (Joonis 1 A). (Bell ja Dutta, 2002; Lygerou *et al.*, 2000; Maiorano *et al.*, 2000; Remus *et al.*, 2009; Yekezare *et al.*, 2013) Litsentseerimine toimub hilises mitoosis ja G<sub>1</sub> faasis (Dahmann *et al.*, 1995), kuid pre-RC koosseisu kuuluv MCM2-7 kompleks on nendes faasides inaktiivne, st ei oma DNA lahtiharutamiseks vajalikku helikaasset aktiivsust (Remus *et al.*, 2009).

Neljateistkümnest pre-RC moodustamiseks vajalikust valgust kümme kuuluvad AAA+ (ingl *ATPases associated with diverse cellular activities*) ATPaaside perekonda – Cdc6, MCM2-7 ning ORC subühikud Orc1, Orc4 ja Orc5 (Iyer *et al.*, 2004; Neuwald *et al.*, 1999). Nende poolt ATP sidumine või hüdroolüüs on vajalik seondumiseks DNA ja üksteisega, aga ka õigel hetkel DNA või üksteise küljest vabanemiseks (Klemm *et al.*, 1997; Randell *et al.*, 2006). Kõigepealt tunneb ORC ära replikatsiooni alguspunkti ja seondub DNA-ga (Bell ja Stillman, 1992). Seejärel saab ORC-ga interakteeruda valk Cdc6, misjärel laetakse Cdt1 vahendusel

DNA-le kaks MCM2-7 heksameeri (Joonis 1 A) (Evrin *et al.*, 2009; Frigola *et al.*, 2013; Remus *et al.*, 2009). Valgud ORC, Cdc6 ja Cdt1 ei mängi pärast MCM2-7 kromatiinile laadimist enam replikatsioonis rolli ning edasistes protsessides osalevad juba järgmised regulaatorvalgud (Randell *et al.*, 2006). Kaks dsDNA-le laetud MCM2-7 kompleksi moodustavad kaksikheksameeri, milles on nad omavahel ühendatud nende N-terminuste kaudu, et helikaasid oleksid S faasis toimuva aktiveerimise järel DNA mõlemasuunaliseks sünteesiks õiges orientatsioonis (Evrin *et al.*, 2009).

### 1.1.2 Helikaasi aktiveerimine

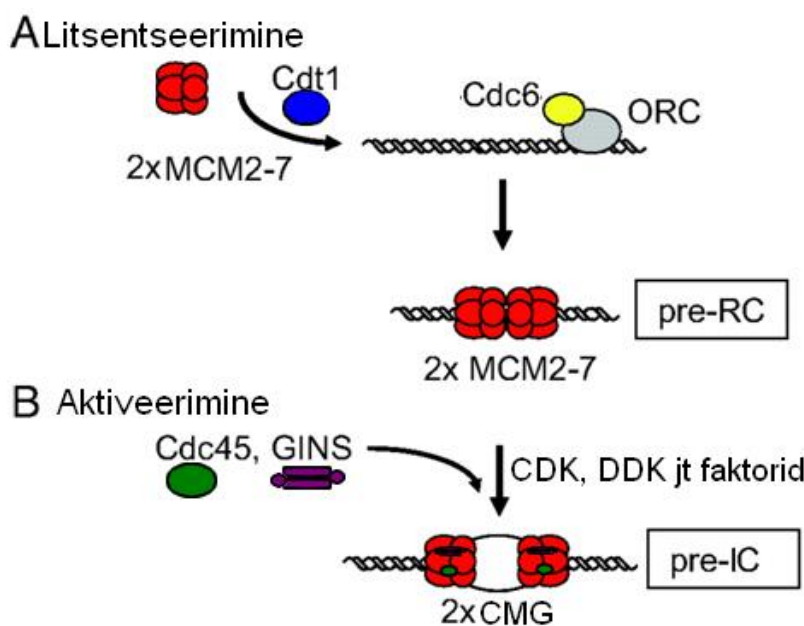
Helikaasi MCM2-7 aktiveerimine toimub S faasis (Aparicio *et al.*, 1997). Selle käigus pre-RC kaksikheksameer lahknub kaheks ja seonduvad mitmed valgud, mis moodustavad pre-initsiatsiooni kompleksi (pre-IC, ingl *pre-initiation complex*) (Joonis 1 B) (Evrin *et al.*, 2009). Pre-IC moodustumine kulmineerub replisoomi kokkupanekuga ja aktiivse DNA replikatsiooni käivitumisega (Sclafani ja Holzen, 2007).

Pre-RC kompleksis oleva inaktiivse MCM2-7 heksameeri aktiveerimiseks seonduvad temaga valgud Cdc45 (ingl *cell division cycle 45*) ja GINS (jpn *Go-Ichi-Ni-San*) (Ilves *et al.*, 2010), mis moodustavad kokku replikatiivse helikaasi CMG (Aparicio *et al.*, 1997). GINS on heterotetrameerne valk, mille nimi tuleneb jaapani keele numbritest 5, 1, 2, 3, tähistamaks subühikuid Sld5 (ingl *synthetically lethal with dpb11-1 5*), Psf1, Psf2 ja Psf3 (ingl *partner of Sld five*) (Takayama *et al.*, 2003). Kõik CMG komponendid on vajalikud mitte ainult replikatsiooni initseerimiseks, vaid ka elongatsiooniks, kuid on mitmeid faktoreid, mis on vajalikud ainult CMG kompleksi moodustumiseks. Kõige paremini on neid faktoreid kirjeldatud pagaripärmis: Sld2, Sld3, Sld7, Dpb11 (ingl *DNA replication regulator DNA Polymerase B*), ning protsessi reguleerivate faktoritena kaks proteiinkinaasi CDK (ingl *cyclin-dependent kinases*) ja DDK (ingl *Dpb7 dependent kinase*). Hulkraksetel on leitud ortolooge kõikidele nendele valkudele, peale Sld7. Lisaks CDK ja DDK kinaasidele osalevad CMG kompleksi kokkupanekus hulkraksetes Sld2, Sld3 ja Dpb11 tõenäolised funktsionaalsed homoloogid vastavalt RecQL4 (ingl *RecQ helicase-like 4*), treslin-TICRR (ingl *TOPBP1-interacting checkpoint and replication regulator*) ja TopBP1 (ingl *topoisomerase II binding protein 1*) (Kumagai *et al.*, 2010; Matsuno *et al.*, 2006; Sanchez-Pulido *et al.*, 2010; Sangrithi *et al.*, 2005; Sansam *et al.*, 2010). CMG kompleksi moodustumise molekulaarne mehhanism on hulkraksetes oluliselt vähem selge kui pärmis ja kindlasti ka oluliselt komplekssem, mida näitab muuhulgas ka mitmete praeguseks kirjeldatud lisafaktorite protsessis osalemine, näiteks GEMC1 (ingl *geminin coiled-coil domain-containing protein 1*), Idas, DUE-B (ing



DNA unwinding element binding protein) ja MCM9, millele pole leitud selgeid ortolooge pärmis (Balestrini *et al.*, 2010; Chowdhury *et al.*, 2010; Lutzmann ja Méchali, 2008; Pefani *et al.*, 2011).

Cdc45 ja GINS muudavad MCM2-7 kompleksi konformatsiooni nii, et ta oleks võimeline ATP-d hüdrolüüsima ja DNA-d lahti harutama (Ilves *et al.*, 2010). Aktiivne CMG kompleks ümbritseb üheaheelalist DNA-d (ssDNA, ingl *single strand DNA*) ja eemaldub replikatsiooni alguspunktist juhtival ahelal 3'→5' suunas (Ilves *et al.*, 2010), luues ühtlasi baasi tervikliku replisoomi moodustumiseks ja DNA sünteesiks replisoomi koosseisu kuuluvate DNA polümeraaside  $\alpha$ ,  $\epsilon$  ja  $\delta$  poolt (Sclafani ja Holzen, 2007).



**Joonis 1 Replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine ja helikaasi aktiveerimine.** A Replikatsiooni alguspunktide litsentseerimisel osalevad valgud ORC, Cdc6 ja Cdt1, mille abil laetakse dsDNA-le kaks MCM2-7 kompleksi. Moodustub pre-RC, mis kujutab endast inaktiivset MCM2-7 kaksikheksameeri koos laadimises osalevate valkudega. B Helikaasi MCM2-7 aktiveerimiseks on vajalikud valgud Cdc45 ja GINS. Nende seondumisel moodustub kaks DNA-d lahti harutavat ning ssDNA-d ümbritsevat replikatiivset helikaasikompleksi CMG. Aktiveerimises osalevad ka mitmed lisafaktorid, sh CDK ja DDK. Modifitseeritud joonis Evrin *et al.*, 2009 järgi.

### 1.1.3 Replikatsiooni initsiatsiooni regulatsioon

Korrektne replikatsiooni initsiatsiooni regulatsioon tagab, et kogu genoom kopeeritakse rangelt üks kord rakutsüklis. Replikatsiooni initsiatsiooni valesti reguleerimine võib põhjustada kromosomaalse DNA lõikude topelt või puudulikku replikatsiooni ning replikatiivset stressi, mis soodustab rakkude kasvajaliseks muutumist. (Blow ja Gillespie, 2008; Gonzalez *et al.*, 2005)

Eukarüoodid reguleerivad replikatsiooni initsiatsiooni peamiselt modifitseerides CMG helikaasi kokkupanekut ja aktivatsiooni posttranslatsiooniliselt (Remus ja Diffley, 2009). Keskset rolli omavad selles tsükliin sõltuvad kinaasid (CDK-d), millede aktiivsus on rakutsükli faasides erinev (Arias ja Walter, 2007). CDK-d on G<sub>1</sub> faasis inaktiivsed, mille tõttu saab replikatsiooni alguspunktides moodustuda pre-RC. Kuid S faasis CDK-de aktiivsus tõuseb, mis võimaldab erinevatel faktoritel MCM2-7 kompleksi aktiveerida, aga samaaegselt inhibeerib läbi mitmete mehhanismide MCM2-7 kompleksi laadimise replikatsiooni alguspunktidesse ja uute pre-RC-de moodustumise (Diffley, 2004). Need vastanduvad efektid lahutavad ajaliselt helikaasi laadimise ja aktiveerimise, tagades, et igast replikatsiooni alguspunktist algab DNA süntees vaid ühe korra rakutsükli jooksul (Siddiqui *et al.*, 2013).

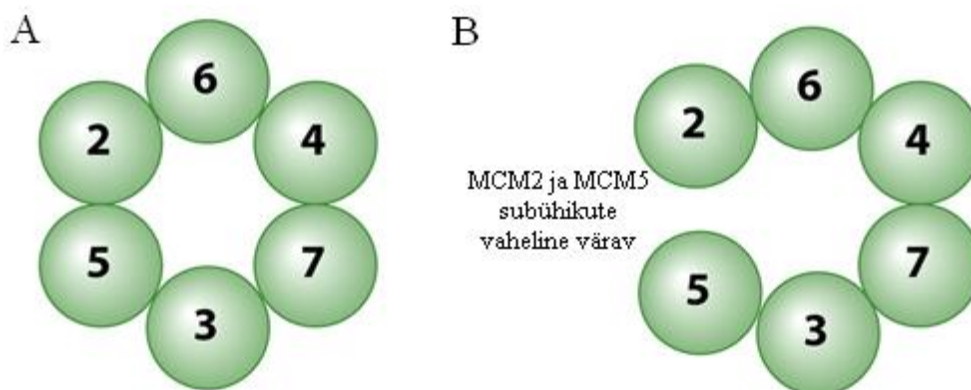
Litsentseerimine leiab aset ainult hilises mitoosis ja G<sub>1</sub> faasis (Dahmann *et al.*, 1995), kuna sel ajal on inaktiivsed kõik kolm peamist litsentseerimist inhibeerivat faktorit: CDK, Geminin ja CRL4 (ingl *cullin4 RING (really interesting new gene) E3 ubiquitin ligase*) (Yekezare *et al.*, 2013). CDK toimib inhibeerivalt mitmetele pre-RC komponentidele (Bell ja Dutta, 2002; Diffley, 2004). Geminin (puudub pärmis) seondub Cdt1-ga, blokeerides sellega MCM2-7 helikaasi laadimise ning takistades litsentseerimist (McGarry ja Kirschner, 1998). CRL4 ubikvitiin ligaas märgistab Cdt1, misjärel Cdt1 lagundatakse (Havens ja Walter, 2011).

Helikaasi aktiveerimine toimub S faasis, mil CDK ja DDK kinaaside aktiivsusest sõltuvad molekulaarsed rajad võimaldavad MCM2-7 kompleksiga seonduda aktivatsiooniks vajalikel Cdc45 ja GINS valkudel (Arias ja Walter, 2007; Bell ja Dutta, 2002). DNA kahjustuste ja replikatiivse stressi poolt aktiveeritud regulatiivsed rajad blokeerivad replikatsiooni initsiatsiooni läbi nii CDK kui ka DDK sõltuvate aktivatsiooniradade inhibeerimise (Falck *et al.*, 2001; Heffernan *et al.*, 2007; Merrick *et al.*, 2004).

#### **1.1.4 Replikatiivse helikaasi mootorvalkude kompleks MCM2-7**

MCM2-7 kompleks on helikaas, mis hüdrolüüsib ATP-d ja harutab lahti dsDNA-d, kuid on ilma Cdc45 ja GINS valkudeta inaktiivne. Koos moodustavad nad replikatiivse helikaasi CMG, milles MCM2-7 on molekulaarne mootor (Ilves *et al.*, 2010). Eukarüootides koosneb replikatiivse helikaasi mootorvalkude kompleks kuuest subühikust (Tye, 1999), mis moodustavad DNA-d ümbritseva (Remus *et al.*, 2009) heksameerse ringi kindlas järjekorras: MCM5 → MCM3 → MCM7 → MCM4 → MCM6 → MCM2 (Joonis 2). Subühikute MCM2 ja MCM5 vahelist ühendust nimetatakse väravaks (Joonis 2 B), sest nendevaheline side on

kõige nõrgem (Davey *et al.*, 2003) ja sealt avaneb MCM-ide ring, et kompleksi saaks DNA-le laadida (Bochman ja Schwacha, 2008; Costa *et al.*, 2011).



**Joonis 2** Heksameerse MCM2-7 kompleksi subühikute paigutus. A Kompleksi suletud konformatsioon; B Kompleksi avatud konformatsioon. Näidatud subühikute MCM2 ja MCM5 vaheline värav. Modifitseeritud joonis Bochman ja Schwacha, 2009 järgi.

MCM valkude järjestuses eristatakse kolme domeeni: N- ja C-terminaalse domeeni vahel asub AAA+ ATPaasi domeen (Barry *et al.*, 2007; Jenkinson ja Chong, 2006). N-terminaalne domeen on oluline heksameeri moodustumisel (Fletcher *et al.*, 2003), DNA-ga seondumisel (Costa *et al.*, 2008) ja helikaasi aktiivsuse reguleerimisel, viimases osaleb ka C-terminaalne domeen (Barry *et al.*, 2007). MCM3 C-terminaalne domeen on vajalik replikatsiooni alguspunktidesse Cdt1 vahendusel MCM2-7 kompleksi kohaletoimetamiseks ja ORC–Cdc6 vahendusel dsDNA-le laadimiseks (Frigola *et al.*, 2013). Seega on MCM3 kaudu võimalik reguleerida kogu MCM2-7 laadimist ja taset replikatsiooni alguspunktides (Chuang *et al.*, 2012). AAA+ ATPaasi domeen sisaldab AAA+ valkudele omaseid motiive (Walker A ja B, sensor 1 ja 2, arginiinisõrm), mis kõik on vajalikud ATP sidumiseks või hüdroolüüsiks (Sakakibara *et al.*, 2009). AAA+ ATPaasi domeen sisaldab lisaks ka kolme  $\beta$ -juuksenõela: välimine juuksenõel (ingl *external hairpin*), H2I (ingl *helix-2-insertion*) ja PS1 (ingl *pre-sensor 1*), millest H2I ja PS1 on omased ka teistele AAA+ valkudele. Kõik nimetatud juuksenõelad osalevad tõenäoliselt interaktsioonides DNA-ga ja ka DNA duplexi lahtiharutamises (McGeoch *et al.*, 2005; Sakakibara *et al.*, 2009). Ka N-terminaalne domeen sisaldab ühte juuksenõela. MCM2-7 kompleksis on N-terminaalne, H2I ja PS1 juuksenõelad suunatud tsentraalsesse kanalisse ja välimine juuksenõel välja poole (Bochman ja Schwacha, 2009).

## 1.2 Oksüdatiivse stressi vastusrada KEAP1-NRF2

Eukarüootide rakud puutuvad kokku nii sisemiste kui väliste reaktiivsete hapnikuühendite allikatega ja teiste keemiliselt reaktiivsete ühenditega, mis võivad kahjustada bioloogilisi makromolekule nagu DNA, valgud ja lipiidid (Imlay, 2003). Bioloogiliste makromolekulide oksüdatiivsel kahjustumisel on suur mõju rakulistele funktsioonidele ja seda on seostatud vähi, põletiku, südameveresoonkonna ja neurodegeneratiivsete haigustega (Andreassi, 2003; Golden *et al.*, 2002; Nathan, 2002; Rao ja Balachandran, 2002). Seega on väga oluline rakke oksüdeerijate ja elektrofiilide eest kaitsta ning üks põhiline mehhanism selleks on KEAP1-NRF2 (ingl *Kelch-like ECH(erythroid cell-derived protein with CNC homology)-associated protein 1; nuclear factor erythroid 2 related factor 2*) signaalirada (Baird ja Dinkova-Kostova, 2011; Jaramillo ja Zhang, 2013). KEAP1-NRF2 signaalirada aktiveerivad mitmed rakulised stressitingimused, näiteks oksüdatiivne stress, endoplasmaatilise retiikulumi stress ja teised, ning struktuurilt mitmekesised endogeenset ja eksogeenset päritolu väikesed molekulid ehk indutseerijad (Baird ja Dinkova-Kostova, 2011).

KEAP1 on oksüdatiivse stressi sensorvalk (Itoh *et al.*, 1999), mis moodustab rakus homodimeeri (Ogura *et al.*, 2010). Tal on kolm funktsionaalset domeeni. BTB (ingl *broad complex/tramtrack/bric-a-brac*) domeen seob valku Cullin 3 ja on vajalik KEAP1 dimeriseerumiseks (Lo *et al.*, 2006; Ogura *et al.*, 2010; Zipper ja Mulcahy, 2002). Kelch ehk CGR (ingl *double glycine repeat*) domeen on vajalik ETGE motiivi sisaldavate valkudega (nt NRF2, MCM3) seondumiseks (Hast *et al.*, 2013). IVR (ingl *intervening region*) domeen ühendab BTB ja Kelch domeene ja sisaldab mitmeid tsüsteiini jääke, mille kaudu reguleeritakse KEAP1 aktiivsust (Kobayashi *et al.*, 2004).

KEAP1 homodimeer seondub transkriptsioonifaktor NRF2-ga ja on selle negatiivne regulaator (Itoh *et al.*, 1999; Ogura *et al.*, 2010). NRF2 suudab kaitsta rakke ja kudesid erinevate toksiliste ainete, oksüdatiivse stressi ja kartsinogeenide eest, suurendades mitmete tsütoprotektiivsete geenide ekspressiooni. NRF2 seotus vähitekketega on samas vastuoluline, sest NRF2 võib samamoodi kui normaalseid rakke kaitsta ka kasvaja rakke kemoterapeutiliste ainete eest, abistades sellega kasvaja edasi arenemist (Jaramillo ja Zhang, 2013). NRF2 sisaldab N-terminaalses otsas kahte seondumissaiti – motiivid ETGE ja DLG, mis aitavad reguleerida NRF2 stabiilsust ja mille kaudu NRF2 interakteerub KEAP1 homodimeeriga (Ogura *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2006a). Rakule optimaalsetes tingimustes asub NRF2 peamiselt kompleksis KEAP1-ga läbi otseste valk-valk interaktsioonide KEAP1 dimeeri

Kelch domeenide ja NRF2 ETGE ja DLG motiivide vahel. KEAP1 seob ETGE motiivi kõrgema afiinsusega kui DLG motiivi (McMahon *et al.*, 2006; Tong *et al.*, 2006b). KEAP1-ga on seotud ka Cullin 3 sõltuv E3 ubikvitiin ligaas kompleks (ingl *cullin 3 dependent E3 ubiquitin ligase complex*), mis märgistab NRF2 polüubikvitiinketiga, misjärel saadetakse NRF2 proteasomaalsele lagundamisele ja ta tase rakus hoitakse seeläbi madal (Cullinan *et al.*, 2004). KEAP1 Kelch domeen on vajalik NRF2-ga seondumiseks (McMahon *et al.*, 2004), kuid kõik kolm KEAP1 domeeni mängivad olulist rolli NRF2 ubikvitinüleerimisel ja represseerimisel (Jaramillo ja Zhang, 2013). Oksüdatiivse stressi tingimustes modifitseeritakse KEAP1 IVR domeenis asuvaid tsüsteiini jääke nii, et tekkinud struktuursete muutuste tagajärjel NRF2 enam KEAP1 sõltuvalt ei lagundata, NRF2 valk stabiliseerub (Kobayashi *et al.*, 2004) ja liigub tuuma, kus ta aktiveerib erinevate anti-oksüdatiivsete geenide transkriptsiooni (Itoh *et al.*, 1999).

### **1.2.1 Helikaasi MCM2-7 subühikud interakteeruvad KEAP1-ga**

Mitmed teisedki valgud sisaldavad ETGE motiivi ja seonduvad selle kaudu KEAP1-ga, konkureerides niimoodi NRF2-ga, mis võib aktiveerida KEAP1-NRF2 signaaliraja. Enamuse nende valkude puhul on seni ebaselge nende võimalik seotus oksüdatiivse stressi regulatsiooniga ning nende hulgas on väga erineva funktsiooniga valke. See võib viidata sellele, et erinevate ETGE motiiviga valkude interaktsioon KEAP1-ga võib omada rolli ka muudes rakulistes protsessides peale oksüdatiivse stressi vastuse (Hast *et al.*, 2013). ETGE motiivi sisaldavate valkude hulgas on ka replikatiivse helikaasi mootorvalkude kompleksi MCM2-7 subühik MCM3 (Hast *et al.*, 2013; Ilves, publitseerimata andmed). Lisaks on meie laboris biokeemiliste katsetega näidatud, et KEAP1 interakteerub ka MCM7-ga, kuid nõrgemini kui MCM3-ga, sest MCM7 sisaldab ETGE motiivi asemel nõrgema KEAP1 seondumisasiinsusega VSGE motiivi (Ilves, publitseerimata andmed). MCM3 ETGE ja MCM7 VSGE motiivid paiknevad nende valkude H2I juuksenõelas (Jenkinson ja Chong, 2006), mis on suunatud MCM2-7 kompleksi tsentraalsesse kanalis (Bochman ja Schwacha, 2008) ja võib osaleda DNA-ga seondumises (Sakakibara *et al.*, 2009).

Oksüdatiivse stressi sensorvalgu KEAP1 seondumine replikatiivse helikaasikompleksi subühikutega võib olla seotud DNA replikatsiooni takistamisega oksüdatiivse stressi tingimustes, et vältida kahjustunud DNA kopeerimist. Kuna MCM2-7 kompleksi taseme regulatsioon replikatsiooni alguspunktides käib subühiku MCM3 kaudu (Chuang *et al.*, 2012), siis võib MCM3 olla KEAP1-le sihtmärgiks replikatiivse helikaasi lagundamiseks oksüdatiivse stressi korral. Lisaks võib helikaasikompleksi regulatsioon DNA kahjustuste

korral käia läbi subühiku MCM7, kuna on näidatud, et ta seondub mitmete DNA kahjustuse korral aktiveeritavate valkudega (Bochman *et al.*, 2008).

## 2 EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

KEAP1 dimeer interakteerub oma kõige paremini kirjeldatud interaktsioonipartneri NRF2-ga selle ETGE ja DLG motiivide kaudu (Ogura *et al.*, 2010) ning selline seondumine reguleerib NRF2 valgu taset läbi ubiquitinüleerimise ja sellest sõltuva proteolüüsi 26S proteasoomis. KEAP1 interakteerub ka replikatiivse helikaasikompleksi subühikute MCM3 (Ilves, publitseerimata andmed; Hast *et al.*, 2013) ja MCM7-ga (Ilves, publitseerimata andmed) vastavalt nende ETGE ja VSGE motiivide kaudu ning selle interaktsiooni roll rakus ei ole teada. Arvestades analoogiat NRF2-ga, oli käesoleva bakalaureusetöö eesmärkideks:

- 1) uurida, kas KEAP1 reguleerib MCM3 ja MCM7 valkude taset ja kas nende subühikute kaudu võib käia ka teiste MCM2-7 kompleksi subühikute taseme regulatsioon;
- 2) nendeks katseteks vajalike tingimuste optimeerimine – leida sobivaim rakuliin, transfektsioonireagent ja transfekteeeritav DNA kogus.

### 2.2 Materjal ja metoodika

#### 2.2.1 Ekspressioonivektorid ja nende kloonimine

Käesolevas töös kasutati kõrge koopiarvuga ekspressioonivektorit pQM-Ntag/Ai+ (Quattromed), mis lisab ekspresseeritavate valkude N-terminaalsesse otsa E2 epitoopmärgise. Plasmiid pQM-Ntag/Ai+ sisaldab lisaks multikloneerimisalale ja E2 märgisele Simian viirus 40-e (SV40) replikatsiooni alguspiirkonda, polü-A järjestust, ampitsilliini resistentsusgeeni ja tsütomegaloviiruse (CMV) promooterit. Osadele ekspressioonikonstruktidele lisati ka flag epitoopmärgis ning need klooniti kõrge koopiarvuga vektorisse pQM-CTag/Ai+ (Quattromed).

Vektoritelt ekspresseeriti inimese (Hs, *Homo sapiens*) metsiktüüpi (wt) või muteeritud (mut) valke. Juurde ekspresseeritud valkude tuvastamiseks *western blot* meetodil kasutati E2 (SSTSSDFRDR) ja flag (DYKDDDDK) epitoopmärgiseid. MCM3 mut valgus on KEAP1 interaktsiooniks vajalik ETGE motiiv asendatud aminohappelise järjestusega GAGA, selleks on tehtud asendused E387G, T388A ja E390A. KEAP1 mut valgus on interaktsiooniks MCM3 ja MCM7-ga vajalikud aminohapped asendatudalaniinidega. Meie laboris on näidatud, et need mutatsioonid on piisavad, et valgud ei saaks *in vitro* interakteeruda (Ivar Ilves, avaldamata andmed). Tabelis 1 on esitatud kokkuvõtvalt kasutatavate vektorite andmed.

Kontrolltransfektsioonides kasutati tühja pQM-Ctag/Ai+ (Quattromed) vektorit.

Lisaks kasutati transfektsioonireagentide efektiivuse testimisel pEGFP NLS plasmidi, millelt ekspresseeriti tuumalokalisatsiooni signaaliga fluorestseeruvat valku EGFP.

**Tabel 1 Töös kasutatud ekspressioonivektorid.** Muteeritud valke tähistatakse lühendiga mut, metsiktüüpi valke eraldi ei märgita või tähistatakse lühendiga wt. Allika tulbas on näidatud, millised vektorid on valmistatud selle töö autori poolt, millised kolleegide poolt. On ära toodud ka NCBI andmebaasi referents järjestuse kood. Selgitus tulbas on näidatud, millist valku sellelt vektorilt ekspresseerida saab ja millised asendused on tehtud muteeritud valkudes.

Vektor	Allikas	NCBI andmebaasis referents järjestus	Selgitus
pQM-E2-MCM2	See töö	NM_004526.3	Metsiktüüpi E2 märgisega MCM2 valk
pQM-E2-MCM3 wt	See töö	NM_002388.4	Metsiktüüpi E2 märgisega MCM3 valk
pQM-E2-MCM3 mut	See töö	NM_002388.4	Muteeritud (E387G, T388A ja E390A) E2 märgisega MCM3 valk
pQM-E2-MCM4	See töö	NM_005914.3	Metsiktüüpi E2 märgisega MCM4 valk
pQM-E2-MCM5	See töö	NM_006739.3	Metsiktüüpi E2 märgisega MCM5 valk
pQM-E2-MCM6	See töö	NM_005915.5	Metsiktüüpi E2 märgisega MCM6 valk
pQM-E2-MCM7	Carmen Kivisild	NM_005916.4	Metsiktüüpi E2 märgisega MCM7 valk
pQM-flag-KEAP1 wt	Ivar Ilves	NM_203500.1	Metsiktüüpi flag märgisega KEAP1 valk
pQM-flag-KEAP1 mut	Ivar Ilves	NM_203500.1	Muteeritud (R380A ja R415A) flag märgisega KEAP1 valk
pEGFP NLS	laenatud Mart Ustavi töörühmalt		Tuumalokalisatsiooni signaaliga fluorestseeruv valk EGFP

Sooviti kasutada MCM2-7 subühikuid E2 märgisega. Meie laboris oli olemas juba selline ekspressioonivektor MCM7 jaoks. Valgud MCM2-6 ja MCM3 mut oli vaja ümber kloonida teistelt laboris olemasolevatelt plasmiididelt pQM-Ntag/Ai+ vektorisse, et lisada valkudele E2 märgis. Konstruktide MCM2, 4, 5 ja 6 puhul piisas olemasolevatest vektoritest valkude järjestuste restriктаasidega väljalõikamisest ja nende ligeerimisest samade restriктаasidega lõigatud pQM-Ntag/Ai+ vektoriga. MCM3 wt ja mut järjestused tuli esmalt olemasolevatelt plasmiididelt sobivate oligonukleotiididega PCR reaktsiooni abil paljundada.

Kasutades polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR), paljundati MCM3 wt ja mut järjestused ja lisati nende otstesse sobivate restriктаaside äratundmisjärjestused. Matriitsina kasutati meie labori kogust plasmide pQM-HA-HsMCM3-wt ja pQM-flag-HsMCM3-mut.



Amplifitseerimisel kasutati Phusion DNA polümeraasi (Finnzymes) ja järgmisi laboris olemasolevaid praimereid:

- pärisuunaline CCGTCTCAGATCCATGGCGGGTACCGTGGTG;
- vastassuunaline CGGAAGCTTTCAGATGAGGAAGATGATGCCCTC.

Reaktsioon viidi läbi termotsükleris (Professional Thermocycler, Biometra), kasutades järgnevat programmi:

98°C 30 sekundit	} 32 tsüklit
98°C 10 sekundit	
72°C 45 sekundit	
72°C 5 min	

PCR-i produktid lahutati 0,8 % agarosgeelis DNA geelelektroforeesil TAE (Tris-atsetaat-EDTA) puhvris (40 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA, pH 8,0). Õige pikkusega fragmendid lõigati geelist välja ning puhastati, kasutades *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Machery-Nagel) komplekti vastavalt tootjapoolsele juhendile.

Nii PCR-il saadud MCM3 wt ja mut järjestusi kui ka MCM2, 4, 5 ja 6 valkude järjestusi sisaldavaid olemasolevad plasmide lõigati *FastDigest* restriктаasidega (Thermo Scientific) (Tabel 2). MCM2, 4, 5 ja 6 restriksioonanalüüsi eesmärgiks oli olemasolevast plasmidist välja lõigata valgu järjestust sisaldav fragment ja anda sellele sobivasse vektorisse ligeerimiseks korrektsed otsad. MCM3 wt ja mut PCR-i fragmentide lõikamisel restriктаasidega Esp3I ja HindIII, tekkis valgu järjestusest kaks fragmenti, kuna Esp3I lõikas MCM3 järjestust mitte ainult PCR-i fragmendi otsast, vaid ka seest. Need kaks fragmenti puhastati geelist eraldi ja ligeeriti uuesti kokku enne vektoriga ligeerimist.

Vastavate restriктаasidega lõigati ka pQM-Ntag/Ai+ vektorit. Välja arvatud MCM3 wt ja mut konstruktide korral, mil vektorisse kloonimiseks lõigati pQM-Ntag/Ai+ plasmidi BamHI ja HindIII restriктаasidega, sest restriктаas Esp3I, millega PCR-i produkte lõigati, tekitas PCR-i fragmendi otsa sama kleepuva otsa, mille tekitab BamHI.

Lõikamise toimumiseks inkubeeriti segusid 1 tund 37 °C juures. Peale restriksiooni töödeldi pQM-Ntag/Ai+ plasmidi aluselise fosfataasiga FastAP (Thermo Scientific), et vältida vektori otste uuesti kokkukleepimist ligaasi poolt. Selleks inkubeeriti vastavaid proove koos ensüümiga 37 °C juures 10 minutit ja seejärel 75 °C juures 5 minutit, et ensüüm reaktsioonisegus inaktiveerida. Restriктаasidega lõigatud konstruktid ja vektorid lahutati 0,8 % agarosgeelis DNA geelelektroforeesil. Õige pikkusega fragmendid lõigati geelist välja

ning puhastati, kasutades *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Machery-Nagel) komplekti vastavalt tootjapoolsele juhendile.

**Tabel 2 Restriktaasid, millega lõigati välja pQM-Ntag/Ai+ vektorisse ligeeritavad inserdid.** Vektorit lõigati ka vastavate restriktaasidega, v.a MCM3 wt ja mut konstruktide puhul, mil Esp3I asemel kasutati vektori lõikamiseks BamHI restriktaasi.

Konstrukt	Restriktaasid
pFB1-HsMCM2	BamHI ja KpnI
MCM3 wt PCR-i produkt	Esp3I ja HindIII
MCM3 mut PCR-i produkt	Esp3I ja HindIII
pFB1-HsMCM4	BamHI ja ScaI
pFB1-HsMCM5	BamHI ja HindIII
pFB1-HsMCM6	BamHI ja KpnI

Restrikteeritud konstruktid ja vektorid ligeeriti kokku, kasutades T4 ligaasi (Thermo Scientific). Proove hoiti selleks üleöö 16 °C juures.

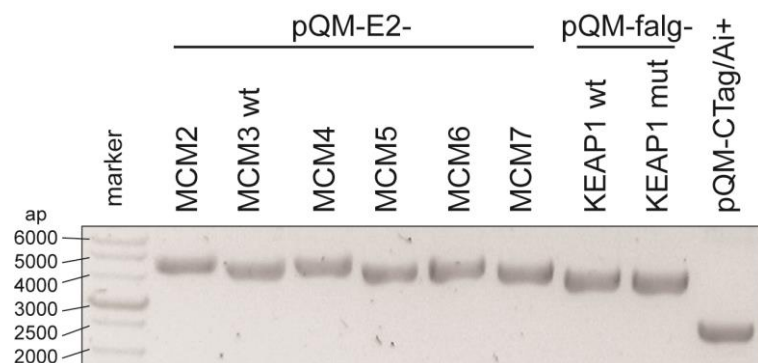
Ligatsiooniproduktid transformeeriti kompetentsetesse *E. coli* tüve DH5α rakkudesse (valmistatud meie laboris kolleegide poolt). 5 µl ligatsioonisegu lisati 50 µl rakkudele, segati õrnalt ja hoiti 30 minutit jääl, nipsutades aeg-ajalt proove. Pärast seda tehti rakkudele 90 sekundiline kuumašokk 42 °C juures ja hoiti jääl 3 minutit. Rakud plaaditi 100 µg/ml ampitsilliini sisaldavale LB agarsöötmele ja inkubeeriti 16 tundi 37 °C juures. Seejärel loksutati tassidelt kogutud baktereid 100 µg/ml ampitsilliini sisaldavas LB vedelsöötmes 16 tundi 37 °C juures. Viimaks koguti rakud, kasutades Heraeus Pico 17 mikrotsentrifuugi kiirusel 3000 rpm 2 minutit, ja eraldati neist plasmiidne DNA, kasutades *FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit* (Favorgen Biotech Corp.) komplekti vastavalt tootjapoolsele juhendile.

Kloonitud vektoreid kontrolliti restriksioonanalüüsiga, kasutades ensüüme KpnI või BamHI. Restriksioonisegud lahutati 0,8 % agarosgeelis DNA geelelektroforeesil. Lisaks saadeti plasmiidid Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse sekveneerimisele labori kogust pärit praimeritega. Sekveneerimise tulemusi analüüsiti programmiga Clone Manager, võrreldes neid NCBI andmebaasi referentsjärjestutega.

Kontrollitud plasmiidide DNA transformeeriti uuesti. Seekord kasutati rakkude kogumiseks Sorvall RC5B Plus tsentrifuugi (rootor SLA-1500) kiirusel 6000 rpm 15 minutit. DNA eraldamiseks kasutati endotoksiinide vaba NucleoBond® Xtra Midi EF (Macherey-Nagel)

plasmiidse DNA puhastamise reagentide komplekti vastavalt tootjapoolsele juhendile. Ka need plasmiidid kontrolliti restriksioonanalüüsi ja sekveneerimisega.

Kõikide töös kasutatud konstruktide kontsentratsioonid mõõdeti masinaga NanoDrop (Thermo Scientific). Vastavalt mõõtmistulemustele kanti kõiki plasmide 0,5 µg 1 % agarosgeelile ning jookutati DNA geelelektroforeesil (Joonis 3). Ka sellelt jooniselt puuduvate plasmiidide (pQM-E2-HsMCM3 mut, pEGFP NLS) kontsentratsioone on samal viisil kontrollitud.



**Joonis 3 Kasutatud ekspressioonivektorid 1 % agarosgeelil.** Kõiki konstrukte on vastavalt NanoDrop'iga mõõdetud kontsentratsioonidele geelile kantud 0,5 µg. Lühend ap tähistab aluspaaride arvu, mis näitab DNA fragmentide pikkust suurusmarkeri (Naxo) rajal.

## 2.2.2 Kasutatud rakuliinid

Rakke kasvatati 10 cm ja 6 cm läbimõõduga koekultuuri tassidel 37 °C juures veeauruga küllastatud ja 5 % CO<sub>2</sub> sisaldusega kappides. Töös kasutati järgmisi rakuliine:

- HeLa – Henrietta Lakcs'i emakakaelavähist eraldatud rakuliin, mida kasvatati seerumiga DMEM söötmes;
- HPEK – inimese eesnahast eraldatud primaarsed epidermaalsed keratinotsüüdid (ingl *human primary epidermal keratinocytes*), mida kasvatati Cnt-57.S söötmes (CELLnTEC);
- HEK – inimese embrüonaalsed neeru rakud 293 (ingl *human embryonic kidney 293 cells*), mida kasvatati seerumiga DMEM söötmes;
- U2OS – inimese sääreluu osteosarkoomist eraldatud rakuliin, mida kasvatati seerumiga DMEM söötmes;
- MEF – hiire embrüonaalsed fibroblastid (ingl *mouse embryonic fibroblasts*), mida kasvatati kas seerumiga DMEM või seerumivabas FibroGRO<sup>TM</sup> Basal Medium (Millipore) söötmes;

- HaCaT – inimese nahast eraldatud keratinotsüüdid, mida kasvatati seerumivabas CnT Prime (CELLnTEC) söötmes või seerumiga DMEM söötmes.

Nimetatud seerumiga DMEM sööde kujutab endast DMEM (*Dulbecco's modified eagle's meedium*; GE Healthcare) söötmesse lisati kõigi rakuliinide puhul 10 % vasika loote seerumit (Imperial).

### 2.2.3 Transfektsioon

Transfektsioonides kasutati rakuliini HaCaT. Rakud külvati 6 cm läbimõõduga koekultuuri tassidele ja transfekteeeriti, kui nad olid saavutanud 70-80 % konfluentsuse. Rakkude transfekteeerimisel kasutati transfektsioonireagente 007 (Icosagen) ja Lipofectamine LTX (edaspidi lipofektamiin; Thermo Fisher Scientific). Reagent 007 on peptiidipõhine ja lipofektamiin on lipiidipõhine transfektsioonireagent. Nad mõlemad on katioonsed ja moodustavad negatiivselt laetud DNA-ga kompleksi, mis transporditakse rakkudesse.

Reagent 007 transfektsioonisegud sisaldasid 100 µl vett, vastavaid plasmide ja transfektsioonireagenti. Lipofektamiini transfektsioonisegud sisaldasid vee asemel 500 µl seerumivaba söödet CnT Prime (CELLnTEC). Rakkude transfekteeerimisel kasutatud plasmidi kontsentratsioonid 6 cm tassi kohta on toodud iga katse kirjelduses. Reagent 007 transfektsioonisegusid inkubeeriti 10 minutit ja lipofektamiini segusid 30 minutit toatemperatuuril. Samal ajal vahetati rakkudel sööde värske söötme vastu. Transfektsioonisegu tilgutati rakkude söötmesse ja segati laiali tassiga kaheksaid tehes. Rakud pandi tagasi inkubatsioonikappi ning olenevalt katsest vahetati neil 3 või 24 tunni möödudes söödet. 24 ja 48 tundi peale transfektsiooni vaadeldi rakke kasvu edenemise ja morfoloogiliste muutuste jälgimiseks mikroskoobis (Nikon Eclipse TS100).

### 2.2.4 Rakkude kogumine voolutustsütomeetria analüüsiks

48 tunni pärast peale transfektsiooni koguti rakud 1 milliliitris PBS-is (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4). Selleks pesti rakutasse esmalt PBS-iga ja inkubeeriti 3-5 minutit 37 °C juures trüpsiin-EDTA-ga (0,05 % trüpsiin, 0,022 % EDTA; Naxo). Trüpsiin inhibeeriti 10 % seerumit sisaldava PBS lahusega. Trüpsiini ja seerumi eemaldamiseks fuugiti (Eppendorf Centrifuge 5810 R, rootor A-5-62) rakke 5 minutit kiirusel 1200 rpm ja eemaldati rakusademelt supernatant. Rakusade suspendeeriti üles 1 milliliitris jääkülmas PBS-is ja hoiti analüüsimiseni jääl. EGFP-d ekspresseerivate rakkude hulk määrati voolutustsütomeetria (ingl *flowcytometer*; BD LSR II) analüüsil.

## 2.2.5 Western blot analüüs

48 tundi peale transfektsiooni pesti rakke PBS-iga ja lüüsi 200 µl 2x Laemmli puhvriga (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 mM EDTA (pH 8,0), 4 % SDS, 20 % glütserool, 288 mM β-merkaptotetanool, broomfenoolsinine). See kallutati tassil ühtlaselt laiali ning koguti kummikaabitsaga 1,5 ml tuubidesse. Tuube inkubeeriti keskmiselt 10 minutit 100 °C juures valkude lõplikuks denatureerimiseks. DNA tükkideks lõhkumiseks sonikeeriti (Diagenode Bioruptor™ UCD-200) proove 5 minutit. Proove säilitati -20 °C juures või kasutati koheselt *western blot* analüüsil.

Valkude lahutamiseks kasutati 10 % SDS-polüakrüülamiidgeeli. Kasutades poolkuiva ülekande puhvrit (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% etanool) ja Trans-Blot® SD ülekandemasinat (Bio-Rad), kanti valgud üle metanoolis aktiveeritud Immobilon-P PVDF (polüvinüülideenfluoriid; Millipore) membraanile. Membraani blokeeriti *western blot* pesulahuses (50 mM Tris-HCl pH7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) valmistatud 5 % BSA-ga (ingl *bovine serum albumin*; Capricorn Scientific) 1 tund toatemperatuuril. Seejärel toimus inkubatsioon primaarset antikeha sisaldavas 2 % BSA lahuses 1 tund toatemperatuuril või üleöö 4 °C juures ning 1 tund toatemperatuuril sekundaarset antikeha sisaldavas 2 % BSA lahuses. Kasutatud antikehad ja lahjendused on ära toodud Tabel 3. Mõlema antikehaga inkubatsiooni järel pesti membraani 3 korda *western blot* pesulahuses 10 minutit. Signaali detekteerimiseks kasutati Amersham ECL (GE Healthcare) ilmutusreagenti ja membraani eksponeeriti röntgenfilmile (AGFA Healthcare).

Tabel 3 Töös kasutatud antikehad ja nende lahjendused.

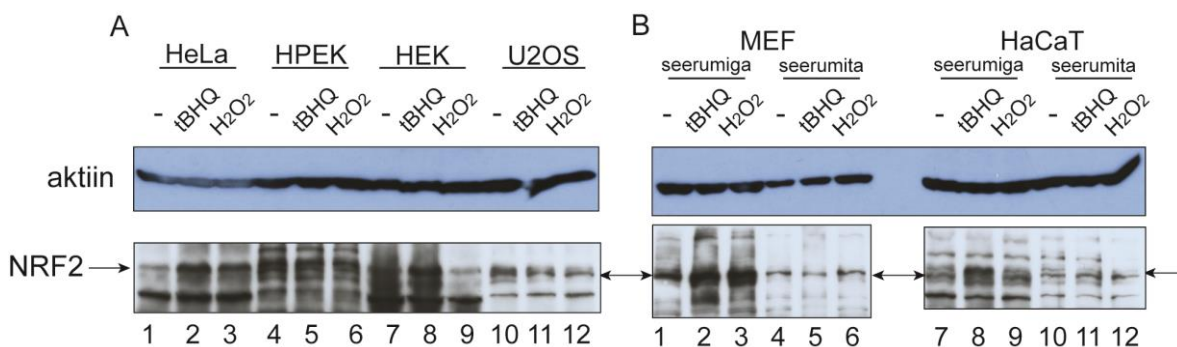
Primaarne antikeha	Tootja	Loom, kelles toodetud	Lahjendus
aktiini vastane (sc-1616), polükloonaalne	Santa Cruz Biotechnology	Kits	1:500
NRF2 vastane (sc-722), polükloonaalne	Santa Cruz Biotechnology	Küülik	1:100
E2 märgise vastane (5E11), monokloonaalne	Icosagen	Hiir	1:1200
flag märgise vastane (F1804), monokloonaalne	Sigma-Aldrich	Hiir	1:1000
<b>Sekundaarne antikeha</b>			
Kitse primaarse antikeha vastane	LabAS	Küülik	1:10000
Küüliku primaarse antikeha vastane	LabAS	Kits	1:5000
Hiire primaarse antikeha vastane	LabAS	Kits	1:5000

## 2.3 Tulemused ja arutelu

### 2.3.1 Katseteks sobiva rakuliini valimine

MCM2-7 subühikute taseme reguleerimist KEAP1 poolt plaaniti uurida kotransfektsiooni katsete abil. Nendeks katseteks oli vaja valida rakuliin, milles KEAP1-NRF2 rada oleks aktiivne, mida näitaks NRF2 taseme tõus vastusena oksüdatiivsele stressile. Selleks analüüsiti rakuliine, mida on mugav kasvatada ja võimalik kõrge efektiivsusega transfecteerida (HeLa, HEK, U2OS, HaCaT), nii loomulikes kui ka stressitingimustes. Kontrollina võrreldi neid primaarsete rakkudega (HPEK, MEF), kus KEAP1-NRF2 rada peaks olema korras.

Rakke kasvatati 10 cm koekultuuri tassidel, iga rakuliini kohta kasutati kolme tassi rakke. Stress indutseeriti ühel tassil 100  $\mu\text{M}$  tertbutüülhüdrokinooni (tBHQ; Sigma-Aldrich) ja teisel tassil 300  $\mu\text{M}$  vesinikperoksiidiga ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Sigma-Aldrich) ning kolmandal tassil rakke ei mõjutatud. Rakkudele lisatava tBHQ vahelahus tehti DMSO-s (dimetüül sulfoksiid; AppliChem) ja  $\text{H}_2\text{O}_2$  lahus PBS-is. Rakud lüüsi 6 tunni pärast ja analüüsiti *western blot* meetodil. Geelile laetud valgumaterjali hulga kontrolliks kasutati kitses toodetud aktiini vastast ja NRF2 taseme muutuse nägemiseks küülikus toodetud NRF2 vastast primaarset antikeha (Tabel 3).



**Joonis 4 Erinevates rakuliinides NRF2 tase ja muutumine stressi tingimustes.** Kõikde rakuliinide uurimiseks kasutati kolme tassi rakke, millest ühte ei mõjutatud, stressi indutseerimiseks lisati ühele 100  $\mu\text{M}$  tertbutüülhüdrokinooni (tBHQ) ja ühele 300  $\mu\text{M}$  vesinikperoksiidi ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Rakud lüüsi 6 tunni pärast ning tehti aktiini ja NRF2 vastaste primaarsete antikehadega *western blot*. Aktiini *western blot* on geelile laetud materjali hulga kontrolliks. NRF2 triip on näidatud nooltega.

NRF2 taseme tõusu on näha nii tBHQ kui ka  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga mõjutatud rakuliinides HeLa (Joonis 4 A, rajad 1-3) ja MEF (Joonis 4 B, rajad 1-3), mis näitab, et nendes rakuliinides töötab NRF2-KEAP1 rada. Rakuliinides HEK (Joonis 4 A, rada 8) ja HaCaT (Joonis 4 B, rajad 8 ja 11), oli NRF2 tõusu näha vaid tBHQ-ga mõjutamisel. Rakuliinis HEK on näha  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga hoopis NRF2 taseme langust (Joonis 4 A, rada 9). Rakuliinides HPEK ja U2OS muutusi NRF2 tasemes ei tähendata (Joonis 4 A, rajad 4-6 ja 10-12).

Selles katses on näha erinevusi NRF2 tasemes sõltuvalt sellest, kas oksüdatiivne stress on indutseeritud H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga või tBHQ-ga. Ka labori kolleegid on näinud H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga NRF2 taseme käitumise erinevust teistest KEAP1-NRF2 raja aktiveerijatest. Seda, et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ei aktiveeri oksüdatiivse stressi vastusradu ootuspäraselt, on hiljuti näidanud ka Saito oma kolleegidega (Saito *et al.*, 2016). Seega ei ole H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksüdatiivse stressi indutseerijana kõige parem reagent, mis seletab ka seda, miks HEK rakuliinis NRF2 tase H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga hoopis langes ja ka teistes rakuliinides (HeLa, HaCaT) oli H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga NRF2 taseme tõus väiksem kui tBHQ-ga.

Kasutatud NRF2 antikehade spetsiifilisus on kehv ja nad annavad palju taustatriipe. Võimalik, et selle taustaseondumise tõttu pole rakuliinis HPEK näha NRF2 taseme tõusu, ning ka seerumita kasvavates HaCaT rakkudes ei ole NRF2 taseme tõus selgelt näha, kuigi meie laboris tehtud katsete põhjal on mõlema rakuliini puhul KEAP1-NRF2 rada töökorras. Seda näitasid katsed, kus rakke enne *western blot*'i fraktsioneeriti, ning ebaspetsiifikaatribud lahkesid erinevate fraktsioonide vahel, tuues välja selgemad NRF2 taseme tõusud nii tBHQ kui ka teiste KEAP1-NRF2 raja aktiveerijate toimel. Samuti näitasid saadud tulemused selget tBHQ põhjustatud NRF2 taseme tõusu seerumiga söötmes kasvavates HaCaT rakkudes (Joonis 4 B, rajad 7-9).

Kuigi nende tulemuste järgi töötab KEAP1-NRF2 rada nii rakuliinis HeLa kui ka HaCaT, siis osutus edasisteks katseteks valituks HaCaT rakuliin. Valiku langetamisel sai määravaks see, et neil rakkudel on säilinud võime keratinotsüütide rajas diferentseeruda, mis näitab, et nad on kultuuri viimise käigus säilitanud olulisel määral oma bioloogilised omadused. Lisaks on neid rakke lihtne kasvatada ja võimalik transfekterida. Edaspidisteks analüüsideks kasvatati HaCaT rakke seerumivabas söötmes, sest oli plaanis kasutada transfektsioonireagenti 007, millega tuleb töötada seerumivabas keskkonnas. Korduv söötme vahetamine võib rakkudele tekitada lisastressi ning mõjutada katsetulemusi.

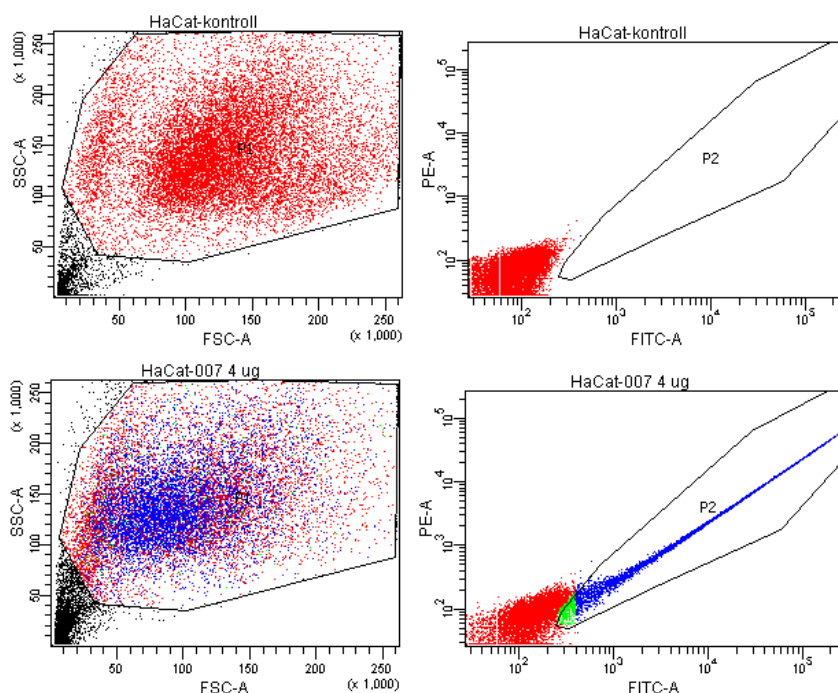
### **2.3.2 Transfektsioonides kasutatava plasmiidse DNA koguse optimeerimine**

KEAP1 mõju MCM2-7 subühikute tasemele sooviti vaadelda kotransfektsiooni katsetega. Enne nende katsete juurde asumist oli vaja paika saada sobivad transfekterimise tingimused. Alustati transfekterimiseks sobiva DNA koguse valimisest.

Leidmaks sobivat DNA kogust, transfekteriti rakkudesse 1, 2, 4, 6 ja 8 µg EGFP-d ekspresseeriva reporterplasmidi DNA-d. Transfekterimiseks kasutati kahte eri transfektsioonireagenti: Lipofectamine LTX (edaspidi lipofektamiin; Thermo Fisher Scientific) ja reagent 007 (Icosagen). Kasutati järgmisi transfektsioonireagenti ja DNA koguse suhteid: 2 µl lipofektamiini 1 µg DNA kohta ja 3,8 µl reagent 007 1 µg DNA kohta.

Nii transfecteeritud DNA kogused kui ka reagenti ja DNA suhted põhinesid tootjapoolsetel soovitusel ning reagent 007 korral ka labori kolleegide eelneval kogemusel teiste rakuliinide transfecteerimisel.

Rakkudel ei vahetatud peale transfecteerimist söödet, transfectsioonireagent oli rakkude kogumiseni peal. Rakud koguti 48 tunni pärast peale transfectsiooni. Transfectsiooni edukuse määramiseks analüüsiti reporterplasmiidilt EGFP valku ekspresseerivate rakkude protsenti ehk transfectsiooni efektiivsust voolutustsütomeetria abil.

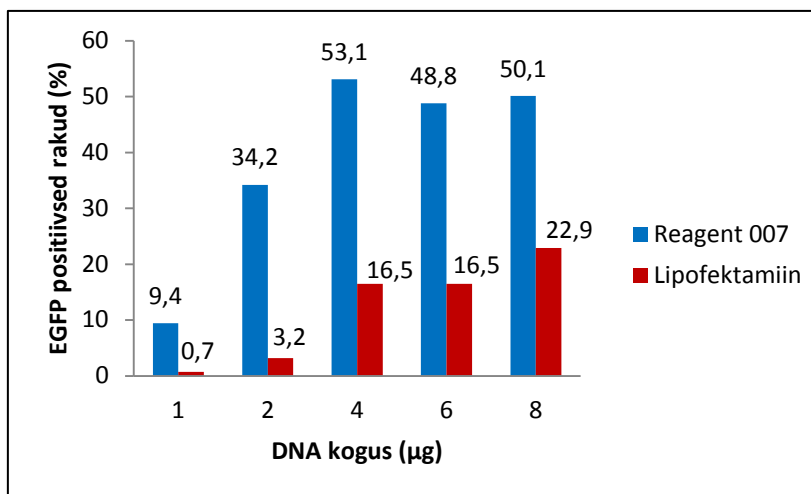


**Joonis 5 Voolutustsütomeetria analüüs.** Ülemistel piltidel on näha katse sisemiseks kontrolliks transfecteerimata rakkude autofluorestsentsi signaalid. Alumistel joonistel on näidatud reagent 007-ga transfecteeritud rakkude pildid, kasutades 4 µg plasmidse DNA kogust.

Rakkudele vastav signaalipilv eraldati granulaarsuse (SSC, ingl *side scatter*) ja suhtelise suuruse (FSC, ingl *forward scatter*) alusel (Joonis 5 vasakpoolsed graafikud, P1). Rakkudele vastavaid partikleid (P1) analüüsiti edasi emissiooni suhtes rohelises (Joonis 5 parempoolsed graafikud, FITC-A X-teljel) ja punases lainealas (Joonis 5 parempoolsed graafikud, PE-A Y-teljel), kus esimene näitab EGFP ekspressiooni ja teine tuleneb autofluorestsentsist. P2 analüüsiaknas on EGFP positiivsete rakkude signaal (sinine ja roheline). P2 aknaga eristatakse autofluorestsentsiga (punane) rakud EGFP positiivsetest (sinine ja roheline) rakkudest – muidu langeks väikeste rakkude EGFP signaal (roheline) ja suuremate rakkude autofluorestsents kokku ning osa EGFP positiivsete rakkude signalist jääks lugemata.



Mõõdeti ära mõlema transfektsioonireagendi ja kõikide DNA kogustega transfekteeeritud rakkude fluorestsentsi signaalid ning nende EGFP positiivsete rakkude protsendi põhjal (P2 aknas olevad signaalid) koostati tulpdiagramm (Joonis 6).



**Joonis 6 DNA koguse optimeerimine.** Näidatud on EGFP positiivsete rakkude protsendid (signaalid P2 aknast), kasutades erinevaid transfektsioonireagente ja reporterplasmidi DNA koguseid.

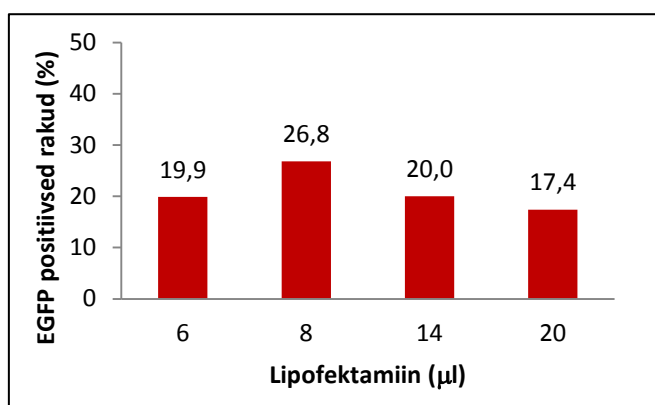
Reagent 007-ga oli transfektsiooni efektiivsus kõikide DNA koguste juures suurem kui lipofektamiiniga. Reagent 007-ga oli transfektsiooni efektiivsus kõige kõrgem, kui rakkudesse transfekteeeriti 4 µg DNA-d, kuid lipofektamiiniga oli kõrgeim efektiivsus 8 µg DNA kasutamisel. Kumbagi reagentiga ei kasva transfektsiooni efektiivsus lineaarselt, st ei kehti olukord, mida rohkem DNA-d, seda efektiivsem transfektsioon. Suured kogused transfektsioonireagenti võivad mõjuda rakkudele toksiliselt, sest rakkude väljanägemine oli seda halvem, mida rohkem transfektsioonireagenti kasutati. Lisaks tuleb rakkudel mingil DNA kogusel ette piir, millest rohkem ei ole võimalik neisse DNA-d sisse viia. Et mitte kulutada asjatult transfektsioonireagenti ja DNA-d ning mitte kahjustada rakke, tuleb leida optimaalne totaalne DNA kogus ning transfektsioonireagenti ja DNA suhe, mida transfektsioonides kasutada. Mõlema transfektsioonireagenti puhul saabus transfektsiooni efektiivsuse platoo 4 µg DNA juures 6 cm koekultuuri tassi kohta ja see kogus valiti ka edasisteks katseteks.

### 2.3.3 Transfektsioonireagenti valik

Järgnevate katsete abil määrati efektiivsem transfektsioonireagent ning sobilik transfektsioonireagenti ja DNA koguse suhe. Selleks analüüsiti transfektsioonireagentide lipofektamiin ja reagent 007 erinevate koguste korral transfektsiooni efektiivsust, kus EGFP reporterplasmidi kogus oli eelnevalt kindlaks tehtud 4 µg.

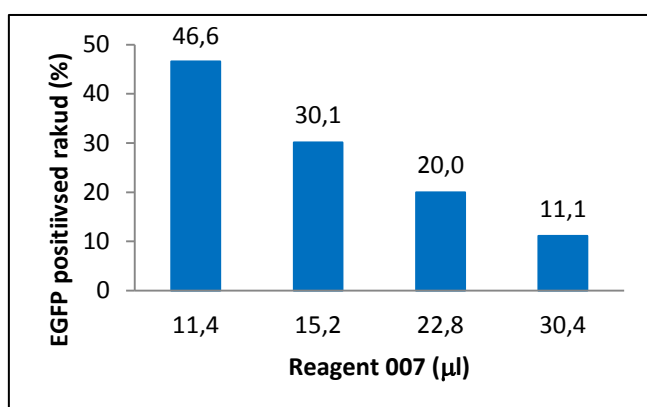
Varemalt oli meie labori kogemustest ja tootjapoolsetest soovitustest lähtuvalt peetud optimaalseks DNA ja reagenti suhteks lipofektamiini korral 1:2 ja reagent 007 korral 1:3,8 ehk 1 µg DNA kohta lipofektamiini 2 µl ja reagent 007 3,8 µl, seega vastavalt 4 µg kohta 8 µl ja 15,2 µl. Sellest lähtuvalt transfecteeriti rakke 6, 8, 14 ja 20 µl lipofektamiiniga ehk vastavalt DNA ja reagenti suhtega 1:3, 1:2, 1:7, 1:10, ning 11,4, 15,2, 22,8 ja 30,4 µl reagenti 007 ehk vastavalt DNA ja reagenti suhtega 1:2,85, 1:3,8, 1:5,7, 1:7,6.

Rakkudel vahetati sööde 24 tunni pärast ning rakud koguti 48 tunni pärast peale transfecteerimist ja määrati voolutustsütomeetriga transfecteerunud rakkude protsent. EGFP positiivsete rakkude protsentide põhjal koostati tulpdiagrammid (Joonis 8 ja Joonis 7).



**Joonis 7 Lipofektamiini erinevad kogused kogused 4 µg DNA kohta 6 cm koekultuuri tassil.** 4 µg DNA kohta kasutati lipofektamiini koguseid 6 µl (suhe 1:3), 8 µl (suhe 1:2), 14 µl (suhe 1:7) ja 20 µl (suhe 1:10).

Lipofektamiini koguse suurendades ei suurene transfectsiooni efektiivsus. Lipofektamiiniga oli transfectsiooni efektiivsus suurim (26,8 %), kasutades transfectsioonireagenti kogust 8 µl ehk DNA ja reagenti suhet 1:2, mis vastab ka soovituslikule optimaalsele suhtele.



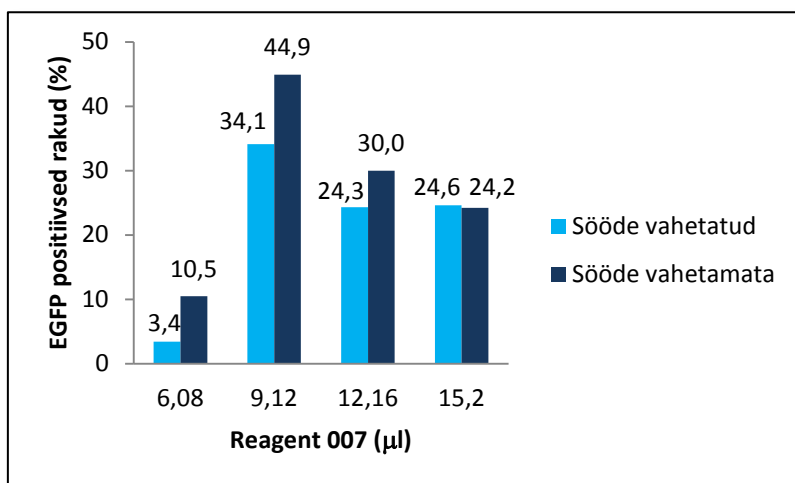
**Joonis 8 Reagent 007 erinevad kogused 4 µg DNA kohta 6 cm koekultuuri tassil.** 4 µg DNA kohta kasutati reagenti 007 koguseid 11,4 µl (suhe 1:2,85), 15,2 µl (suhe 1:3,8), 22,8 µl (suhe 1:5,7) ja 30,4 µl (suhe 1:7,6).

Reagendi 007 koguse suurendamisel ei suurene transfektsiooni efektiivsus, vaid hoopis väheneb. Reagent 007-ga oli transfektsiooni efektiivsus suurim (46,6 %), kasutades transfektsioonireagendi kogust 11,4 µl ehk DNA ja reagendi suhet 1:2,85, mis on seni meie laboris kasutatud suhtest väiksem.

Transfektsioon efektiivsus oli suurem reagent 007-ga (30,1 %, Joonis 7) kui lipofektamiinga (26,8 %, Joonis 7) kasutades seni optimaalseks peetud DNA ja reagendi suhteid, seega valiti edasistes transfektsioonides kasutamiseks reagent 007.

Kuna nähti, et väiksema DNA koguse ja reagendi suhte korral on transfektsiooni efektiivsus reagent 007-ga isegi suurem, siis viidi järgnevalt läbi katse veel väiksemate suhetega, teada saamaks, milline on transfektsioonides kasutamiseks optimaalne DNA ja reagendi 007 suhe. Selleks transfekteeriti rakkudesse 4 µg EGFP reporterplasmidi, kasutades DNA koguse (µg) ja reagendi 007 (µl) suhteid 1:1,52, 1:2,28, 1:3,04 ja 1:3,8 ehk vastavalt 6,08, 9,12, 12,16 ja 15,2 µl reagenti 007. Rakud koguti 48 tunni pärast peale transfekteerimist ja analüüsiti voolutustütomeetriga. EGFP positiivsete rakkude protsentide põhjal koostati tulpdiagramm (Joonis 9).

Samal ajal sobiva transfektsioonireagendi ja DNA suhte valimisega otsustati testida ka söötme vahetamise mõju transfektsiooni efektiivsusele. Eelmise ja järgneva katse tulemuste põhjal sooviti teada saada, kas söötme vahetamine on transfektsiooni efektiivsuse seisukohalt vajalik, ning jaatava tulemuse korral leida, milline aeg on seerumivabas keskkonnas kasvavate rakkude transfekteerimisel söötme vahetamiseks kõige sobivam. Järgnevas katses ei vahetatud osadel rakkudel peale transfektsiooni söödet ja osadel vahetati 3 tunni pärast ning katse tulemusi (Joonis 9) võrreldi eelmise katse (Joonis 8) tulemustega, kus vahetati rakkudel sööde 24 tundi peale transfektsiooni. Lähtudes reagendi 007 transfektsiooni protokollist seerumiga söötmes kasvavatele rakkudele, valiti 3 tunnine söötme vahetamise ajapunkt, et katsete tulemustena saadud optimaalsed transfekteerimise tingimised oleksid rakendatavad ka seerumiga söötmes kasvavate rakkude transfekteerimisel.



**Joonis 9 Reagent 007 koguse täpsem tiitrimine.** 6 cm koekultuuri tassil kasvavatesse rakkudesse transfekeeriti 4 µg DNA-d. Selleks kasutati reagenti 007 koguseid 6,08 µl (suhe 1:1,52), 9,12 µl (suhe 1:2,28), 12,16 µl (suhe 1:3,04) ja 15,2 µl (suhe 1:3,8). Ühel osal rakkudel vahetati sööde 3 tunni pärast transfektsiooni ja teisel osal rakkudel ei vahetatud peale transfektsiooni söödet.

Transfektsiooni efektiivsus rakkudes, millel söödet ei vahetatud, oli suurem või võrdne nende rakkude transfektsiooni efektiivsusega, millel vahetati söödet 3 tunni möödudes. Kui võrrelda selles ja eelmises katses transfektsiooni efektiivsust, kasutades DNA koguse ja reagenti suhet 1:3,8, siis on tulemused ligilähedased, kuid siiski vahetades sööde 24 tunni möödudes, on transfektsiooni efektiivsus veidi suurem (30,1 %, Joonis 8) kui 3 tunni möödudes (24,6 %, Joonis 9) või söödet vahetamata (24,2 %, Joonis 9).

Katsete vahel oli näha EGFP positiivsete rakkude protsentide varieeruvust, mis ilmselt sõltus transfekeerimise hetkel rakkude tihedusest ja muudest faktoritest, ning seega jälgiti rakke ka mikroskoobis. Rakud, millel 3 tunni järel söödet vahetati, olid 24 ja 48 tundi peale transfektsiooni transfekeerimata rakkudele sarnasema väljanägemisega kui rakud, millel söödet ei vahetatud. Kui rakkudel vahetati sööde 24 tundi peale transfektsiooni ja vaadeldi neid mikroskoobis samadel ajapunktidel, siis oli nende väljanägemine vahepealne võrreldes rakkudega, millel vahetati sööde 3 tunni järel ja millel söödet ei vahetatud. Seega on rakkudel peale transfektsiooni söötme vahetamine vajalik, et mitte tekitada neile liigselt stressi, ning kasutades seerumita söötmes kasvavaid rakke, on peale transfektsiooni söötme vahetamiseks sobivaim aeg 24 tunni möödudes. Katse tulemustes on näha ka, et 3 tunni järel söötme vahetamine ei vähenda transfektsiooni efektiivsust märgatavalt ning seega võib sama reagenti ja DNA koguse suhet kasutades transfekeerida ka seerumiga söötmes kasvavaid rakke. Kuid kaasneva võimaliku lisastressi vältimiseks otsustati katsed läbi viia siiski seerumita söötmes kasvavate HaCaT rakkudega.

Arvestades transfektsiooni efektiivsuse katsete tulemusi ja rakkude väljanägemist, otsustati edaspidistes katsetes kasutada DNA koguse ja reagenti suhet 1:3,8. Kuigi transfektsiooni efektiivsus oli suurim DNA koguse ja reagenti suhtega 1:2,28, siis selle suhte kasutamisel transfektsioonides võib transfektsiooni efektiivsus katsete vahel palju varieeruda sõltuvalt pipeteerimise vigadest ja muudest faktoritest. Suhte 1:3,8 juures on ka söötme vahetamise või mitte vahetamise korral transfektsiooni efektiivsus kõige stabiilsem.

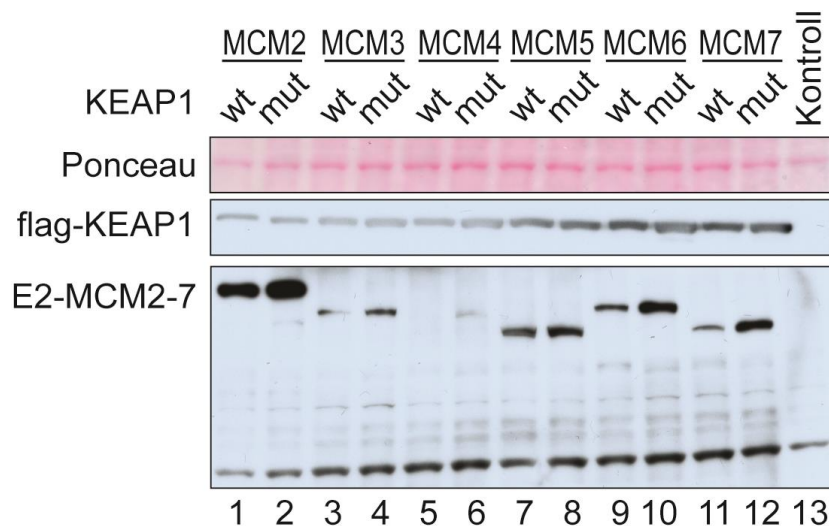
Järgnevates kotransfektsiooni katsetes kasutati seega eelnevate katsete käigus paika pandud tingimusi: katsed viidi läbi 6 sentimeetristel koekultuuri tassidel seerumivabas söötmes kasvavate HaCaT rakkudega, mida transfekteeeriti 4 või 4,5 µg DNA-ga, kasutades transfektsioonireagenti 007 ning DNA koguse (µg) ja reagenti 007 (µl) suhet 1:3,8. Transfektsiooni järgselt vahetati rakkudel sööde 24 tunni möödudes.

### **2.3.4 Replikaasikompleksi MCM2-7 subühikute taset reguleeritakse KEAP1 poolt**

KEAP1 interakteerub replikatiivse helikaasikompleksi subühikute MCM3 (Ilves, publitseerimata andmed; Hast *et al.*, 2013) ja MCM7-ga (Ilves, publitseerimata andmed), kuid selle interaktsiooni roll rakus ei ole teada. Võimalik, et KEAP1 kaudu võib käia nimetatud subühikute ja ka kogu MCM2-7 kompleksi taseme reguleerimine. Uurimaks, kas KEAP1 reguleerib MCM2-7 subühikute taset, viidi läbi kotransfektsioon, kasutades eelnevalt kirjeldatud katsetes optimeeritud transfekteeerimise tingimusi.

Rakke transfekteeeriti, kasutades transfektsioonireagenti 007 ja erinevates kombinatsioonides plasmide, et ekspresserida metsiktüüpi (wt) või interaktsioonidefektset (mut) KEAP1 valku koos MCM2-7 subühikutega. Mutantse KEAP1 korral on interaktsiooniks MCM3 ja MCM7-ga kriitilised aminohapped asendatudalaniinidega (Tabel 1). Et eristada ekspresseeritavaid valke endogeensetest, kasutati valkude küljes olevaid flag ja E2 epitoopmärgiseid. Kasutati pQM-NTag/Ai+ vektorisse kloonitud konstrukte, mis valmistati selle töö raames või olid varem meie laboris olemas.

Rakkudesse transfekteeeriti 4 µg DNA-d, kasutades DNA koguse ja transfektsioonireagenti 007 suhet 1:3,8. Kotransfektsioonil kasutati 2 µg plasmidi, millelt ekspresseeriti flag märgisega KEAP1 wt või mut valku, ja 2 µg plasmidi, millelt ekspresseeriti üks E2 märgisega MCM2-7 subühik.



**Joonis 10 KEAP1 kui MCM2-7 subühikute taseme reguleerija.** Rakke transfecteeriti erinevate metsiktüüpi (E2-MCM2-7, flag-KEAP1 wt) ja mutantset (flag-KEAP1 mut) valku ekspresseerivate plasmiididega ning lüüsi 48 tunni pärast. Kontrollina kasutati tühja vektori transfecteerimist rakkudes (rada 13). *Western blot* analüüs tehti flag ja E2 vastaste primaarsete antikehadega. Ponceau'ga värvitud membraan on geelile laetud materjali hulga kontrolliks.

Ponceau'ga värvitud membraanilt on näha, et kõikidel radadel on materjali hulk võrdne (Joonis 10). Flag *western blot* pildilt on näha, et KEAP1 wt tase on mut tasemest madalam (Joonis 10). Erinevate MCM2-7 subühikute ekspressiooni tasemed on rakkudes erinevad – kõige kõrgem on MCM2 tase, kõige madalam MCM4 tase (Joonis 10).

Võrreldes interaktsioonidefektse (mut) KEAP1 juuresolekul ja metsiktüüpi (wt) KEAP1 juuresolekul MCM2-7 subühikute tasemeid E2 *western blot*'i pildil, on näha, et KEAP1 wt juuresolekul on kõikide MCM2-7 subühikute tase madalam (Joonis 10). Seega reguleeritakse kõikide MCM2-7 kompleksi subühikute tasemeid KEAP1 sõltuvalt.

KEAP1-ga otseselt interakteeruvad vaid MCM3 ja MCM7, järelikult reguleeritakse teisi subühikuid KEAP1 sõltuvalt kas MCM3 ja MCM7 kaudu või mingite muude faktorite vahendusel. Kuna MCM3 C-terminaalne domeen osaleb kogu kompleksi dsDNA-le laadimises (Chuang *et al.*, 2012), siis võib MCM2-7 kompleksi subühikute regulatsioon KEAP1 sõltuvalt käia MCM3 kaudu. KEAP1 interakteerub MCM7-ga nõrgema afiinsusega kui MCM3-ga, kuid sellegi poolest võib MCM7 olla MCM2-7 kompleksi taseme reguleerimises oluline, omades assisteerivat rolli. MCM3 ja MCM7 asetsevad MCM2-7 rõngas kõrvuti (Joonis 2) ning nende KEAP1-ga seonduvate motiivide ETGE ja VSGE kaudu võib käia kogu kompleksi taseme regulatsioon analoogselt transkriptsioonifaktor NRF2 taseme regulatsioonile, mis interakteerub oma ETGE ja DLG motiivide kaudu KEAP1 dimeeriga.

KEAP1 seondumiseks vajalikud MCM3 ja MCM7 motiivid paiknevad nende valkude H2I juuksenõelas (Jenkinson ja Chong, 2006), mis on suunatud MCM2-7 kompleksi tsentraalsesse

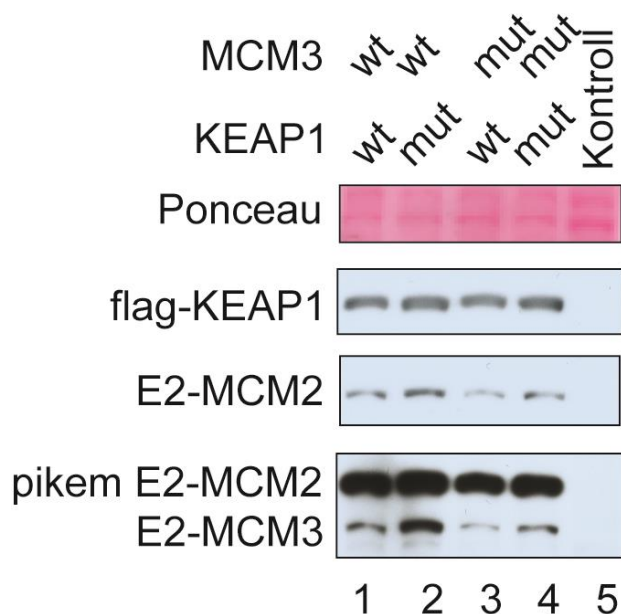
kanalisse (Bochman ja Schwacha, 2008). Kui MCM2-7 kompleks ümbritseb DNA-d, siis tõenäoliselt ei ole võimalik KEAP1-l seonduda MCM3 ja MCM7-ga, kuna seandumiseks vajalikele motiividele pole võimalik ligi pääseda. MCM2-7 ringi tsentraalne kanal on piisavalt lai, et mahutada dsDNA-d (Li *et al.*, 2015), kuid liiga kitsas KEAP1 valgu Kelch domeeni mahutamiseks (Li *et al.*, 2004; Ogura *et al.*, 2010), mille vahendusel MCM3 ja MCM7-ga seundumine toimub. Seega ei mahu Kelch domeen H2I juuksenõeladega seonduma, ilma et MCM2-7 rõngas oleks deformeeritud või osaliselt lagunenu. See võib tähendada aga, et KEAP1 saab interakteeruda MCM3 ja MCM7 subühikutega vaid enne helikaasikompleksi moodustumist või teiste faktorite poolt DNA-lt eemaldatud ja lõhutud MCM2-7 rõnga korral. KEAP1 funktsioon MCM2-7 taseme reguleerimises võib seega olla kõige tõenäolisemalt seotud värskelt sünteesitud MCM2-7 DNA-le laadimise takistamise või DNA-lt eemaldatud MCM2-7 uuesti DNA-le laadimise takistamisega. On näidatud, et KEAP1 rada ei saa olla rakkudele hädavajalik (Wakabayashi *et al.*, 2003) ning seega võib KEAP1 kaudu replikatsiooni reguleerimine olla oluline näiteks spetsiifiliselt oksüdatiivse stressi tingimustes.

### **2.3.5 Pole kindel, kas KEAP1 efekt MCM2 tasemele on vahendatud MCM3 või mõne teise faktori poolt**

Eelmises peatükis kirjeldatud katsetulemuste põhjal võis järeldada, et KEAP1 osaleb MCM2-7 kompleksi subühikute taseme regulatsioonis. Kuna KEAP1 interakteerub MCM subühikutest kõige tugevamini MCM3 valguga, siis võib KEAP1 sõltuvalt käia MCM3 kaudu kogu MCM2-7 kompleksi taseme regulatsioon. Meie laboris eelnevalt tehtud katsete põhjal oli teada, et KEAP1-ga puhastub immunosadestamise katsetes MCM3 valku suurusjärgude võrra rohkem kaasa kui MCM7 ja teisi subühikuid. See näitab, et interaktsioon KEAP1 ja MCM3 vahel on primaarne ning interaktsioon MCM7 subühikuga võib pigem omada vaid assisteerivat rolli, sarnaselt sellele, kuidas NRF2 seondub KEAP1-ga madala ja kõrge afiinsusega motiivide kaudu. Kirjanduses on olemas ka eelnevaid kaudseid tõendeid, et kogu kompleksi regulatsioon võib käia MCM3 kaudu (Chuang *et al.*, 2010) ning seega otsustati seda uurida. MCM2 asub avatud konformatsioonis olevas MCM2-7 rõngas MCM3-st kõige kaugemal ja ei moodusta seepärast MCM3-ga mittetäielikke alamkomplekse (Bochman *et al.*, 2008; Bochman ja Schwacha, 2009) ning seetõttu võeti esmalt järgnevas kotransfektsiooni katses vaatluse alla, kas MCM2 taseme regulatsioon võib KEAP1 sõltuvalt käia MCM3 kaudu.

KEAP1 efekti MCM2 subühiku tasemele uuriti kotransfektsiooni katsetes koos metsiktüüpi või interaktsioonidefektse mutantse MCM3-ga. Rakkudesse transfekteeeriti korraga kolme

plasmidi (kõiki 1,5 µg), millelt ekspresseeriti E2 märgisega MCM2 ja MCM3 metsiktüüpi (wt) või mutantset (mut) ning flag märgisega KEAP1 metsiktüüpi (wt) või mutantset (mut) valku, kasutades DNA koguse ja transfektsioonireagendi 007 suhet 1:3,8. Mutantse KEAP1 korral on interaktsiooniks MCM3-ga vajalikud aminohapped asendatudalaniinidega ja mutantse MCM3 korral on KEAP1-ga interakteeruv ETGE motiiv asendatud motiiviga GAGA (Tabel 1). Meie laboris on näidatud, et need mutatsioonid on piisavad, et valgud ei saaks *in vitro* interakteeruda (Ivar Ilves, avaldamata andmed).



**Joonis 11 MCM2 ja MCM3 tasemete regulatsioon KEAP1 sõltuvalt.** Rakke transfecteeriti metsiktüüpi (E2-MCM2, E2-MCM3 wt, flag-KEAP1 wt) ja mutantset (E2-MCM3 mut, flag-KEAP1 mut) valku ekspresseerivate plasmiididega ning lüüsi 48 tunni pärast. Kontrollina kasutati transfecteerimata rakke – rada 5. *Western blot* analüüs tehti flag ja E2 vastaste primaarsete antikehadega. Ponceau’ga värvitud membraan on geelile laetud materjali hulga kontrolliks.

Ponceau’ga värvitud membraani põhjal on geelile laetud materjali hulk kõikidel radadel ühesugune (Joonis 11). Flag *western blot*’il on näha, et KEAP1 wt tase on KEAP1 mut tasemest madalam (Joonis 11). Nii siin katses kui labori kolleegide katsetes on tähendatud, et MCM3 mut ekspressiooni tase (Joonis 11, rajad 3 ja 4) on madalam kui MCM3 wt tase (Joonis 11, rajad 1 ja 2). Nagu eelmises katseski (Joonis 10) on MCM2 ekspressioonitase tunduvalt kõrgem kui MCM3 ekspressioonitase (Joonis 11).

KEAP1 wt (Joonis 11, rajad 1 ja 3) juuresolekul on MCM2 tase madalam kui KEAP1 mut (Joonis 11, rajad 2 ja 4) juuresolekul. Arvestades selle ja eelmises katse tulemusi, saab järeldada, et MCM2 taseme regulatsioon on KEAP1 sõltuv.

MCM3 wt tase on KEAP1 wt juuresolekul (Joonis 11, rada 1) madalam kui KEAP1 mut juuresolekul (Joonis 11, rada 2). Seega saadakse eelmisele katsele kinnitust, et MCM3 taseme



regulatsioon on KEAP1 sõltuv. Kuid KEAP1 wt juuresolekul on näha ka MCM3 mut madalamat taset (Joonis 11, rada 3), võrreldes KEAP1 mut juuresolekul (Joonis 11, rada 4). Võrreldes MCM3 wt ja mut algtasemeid (Joonis 11, rajad 2 ja 4) vastavate lõpptasemetega (Joonis 11, rajad 1 ja 3), on näha, et KEAP1 poolt MCM3 wt taseme mõjutamine on suhteliselt tugevam kui MCM3 mut taseme mõjutamine ning seega on taseme reguleerimiseks KEAP1 ja MCM3 vaheline interaktsioon vajalik. Mutantne MCM3 ei interakteeru KEAP1-ga, kuid mutantse MCM3 taseme reguleerimine KEAP1 juuresolekul võib tähendada seda, et MCM3 taseme regulatsioon ei toimu mitte ainult otsese KEAP1-ga interaktsiooni läbi, vaid võib olla vahendatud ka teiste KEAP1-st sõltuvate faktorite kaudu.

Võrreldes MCM2 ja MCM3 tasemete erinevusi sõltuvalt KEAP1 wt juuresolekust, on nii selle (Joonis 11) kui eelmise katse (Joonis 10) põhjal näha, et KEAP1 efekt on MCM3-le tugevam kui MCM2-le. See tuleneb tõenäoliselt sellest, et KEAP1 interakteerub MCM3-ga otse, aga MCM2 taseme reguleerimine KEAP1-st sõltuvalt on mingi teise valgu poolt vahendatud.

Kui MCM2 taseme reguleerimine käiks KEAP1 sõltuvalt MCM3 kaudu, siis peaks MCM2 tase olema erinev MCM3 wt ja mut juuresolekul, kuna mutantne MCM3 ei interakteeru KEAP1-ga. MCM2 tase peaks MCM3 wt juuresolekul olema madalam kui MCM mut juuresolekul, kuid siin töös esitatud tulemuste järgi see välja ei tule (Joonis 11, rajad 1 ja 3). Seega ei saa selle katse põhjal öelda, kas MCM2 taseme regulatsioon käib KEAP1 sõltuvalt MCM3 kaudu. Üks võimalik põhjus võib olla see, võrreldes sama epitoopmärgisega juurde ekspresseeritud MCM3 ja MCM2 tasemeid, on näha, et MCM3 tase on oluliselt madalam (Joonis 11). Samuti võivad MCM2 taseme regulatsioonis osaleda lisaks KEAP1 sõltuvale MCM3 vahendatud regulatsioonile ka teised tegurid, mille tõttu ei pruugi vastava katse ülesehituse juures olla mõju näha. Sellele kinnituse leidmiseks tuleks katset korrata, suurendades juurde ekspresseeritava MCM3 hulka, transfecteerides rakkudes rohkem vastavat plasmidi, nii et juurde ekspresseeritava valgu arvelt väheneks ka endogeense wt MCM3 valgu võimalik mõju katse tulemustele.

Selle ja eelmise katse tulemustest lähtuvalt saab öelda, et oksüdatiivse stressi sensorvalgu KEAP1 poolt on reguleeritud kõikide MCM2-7 kompleksi subühikute tase, kuid erinevate subühikute tasemetele on KEAP1 mõju erinev. KEAP1 tundub kõige nõrgemalt mõjutama subühikute MCM2 ja MCM5 taset, veidi tugevamalt subühikute MCM6 ja MCM4 taset ning kõige tugevam mõju näib olema subühikute MCM7 ja MCM3 tasemele. KEAP1 mõjutab kõige rohkem temaga otseselt interakteeruvate subühikute taset, mis näitab, et MCM3 ja MCM7 taseme regulatsioon võib sõltuda otsesest interaktsioonist KEAP1-ga.

Selle lõputöö tulemustest lähtuvalt reguleerib KEAP1 kõikide MCM2-7 kompleksi subühikute taset. Edaspidi tuleks läbi viia veel kotransfektsiooni katseid, et vaadata, kas MCM2-7 subühikute taseme regulatsioon on KEAP1-ga otseselt interakteeruvate subühikute poolt vahendatud. Lisaks on huvipakkuv leida vastus küsimusele, millise mehhanismi kaudu käib KEAP1 vahendatud MCM3 taseme regulatsioon ja kas selleks võib olla NRF2 analoogia põhjal ubikvitinüleerimisest sõltuv proteolüüs. Veel tuleks uurida, kas KEAP1 efekt MCM2-7 subühikute tasemele on sõltuv oksüdatiivsest stressist ja milline on roll selles protsessis MCM7 ja KEAP1 interaktsioonil.

## KOKKUVÕTE

Eukarüootidele on väga oluline täpne DNA replikatsioon, et vältida genoomi ebastabiilsuseni viivate vigade teket. Regulatsioon toimub suuresti initsiatsiooni tasemel, milles osalevad mitmed faktorid ja mis toimub kahes ajaliselt eraldatud etapis. M faasi lõpus ja G<sub>1</sub> faasis toimub kahe inaktiivse helikaasi MCM2-7 laadimine replikatsiooni alguspunktidesse ja S faasis need aktiveeritakse.

MCM2-7 kompleksi subühikutega MCM3 ja MCM7 interakteerub oksüdatiivse stressi sensorvalk KEAP1. On teada, et KEAP1 vahendab transkriptsioonifaktori NRF2 ubikvitinüleerimist ja degradatsiooni 26S proteosoomis. NRF2 seondub KEAP1-ga madala afiinsusega DLG ja kõrge afiinsusega ETGE motiivide abil. Sarnaselt NRF2-le interakteerub KEAP1 kõrgema afiinsusega MCM3 ETGE motiivi ja madalama afiinsusega MCM7 VSGE motiivi kaudu. Seega võidakse valkude MCM3 ja MCM7 taset rakus reguleerida KEAP1 sõltuvalt analoogselt valgule NRF2.

Lõputöö raames valmistati kotransfektsioonide jaoks vajalikud ekspressioonivektorid ning optimeeriti transfektsiooniks vajalikke tingimusi. Kotransfektsioonides kasutati kõige sobilikumaks osutunud rakuliini HaCaT, rakkudesse transfekteeeriti 4 µg DNA-d, kasutades efektiivsemat transfektsioonireagenti 007 ning DNA koguse ja reagendi suhet 1:3,8.

Käesolevas lõputöös näidati kotransfektsiooni katsetega, et kõikide MCM2-7 kompleksi subühikute taset reguleeritakse KEAP1-st sõltuvalt. Kuna KEAP1 interakteerub kõrgema afiinsusega MCM3-ga kui MCM7-ga, siis vaadati, kas kogu MCM2-7 kompleksi regulatsioon võib KEAP1 sõltuvalt käia MCM3 vahendusel, kuid selle lõputöö raames jääb see ebaselgeks. Sellest olenemata on saadud transfekteeerimise tingimuste optimeerimise ja kotransfektsioonide katsete tulemused KEAP1 sõltuva MCM2-7 subühikute taseme regulatsiooni edaspidiseks uurimiseks kasulikud.

# **The regulation of protein levels of replicative helicase complex MCM2-7 subunits by oxidative stress response protein KEAP1**

Gerda Raja

## **SUMMARY**

Precise DNA replication is essential for eukaryotes in order to avoid mistakes that can lead to genomic instability. The regulation of this process is carried out primarily through its initiation, which involves many protein factors and takes place in two temporally separated stages. At the end of the M phase and in the G<sub>1</sub> phase, the loading of two inactive MCM2-7 helicase onto replication origins takes place, and in S phase, these complexes are activated as replicative helicase.

Oxidative stress response protein KEAP1 interacts with subunits MCM3 and MCM7 of the MCM2-7 complex. It is known that KEAP1 mediates ubiquitination and degradation of transcription factor NRF2. KEAP1 binds NRF2 with lower affinity through its DLG motif and with higher affinity through ETGE motif. Like in case of KEAP1 interaction with NRF2, it also binds MCM3 with higher affinity through ETGE motif and MCM7 with lower affinity through VSGE motif. Therefore, the regulation of protein levels of MCM3 and MCM7 by KEAP1 can be analogous to the regulation of NRF2.

In the course of the studies presented in this thesis, the expression vectors for cotransfections assays were constructed and conditions for transfections experiments were optimized. These experiments identified the HaCaT cell line as the most suitable for analysis, and 4 µg of DNA was transfected into these cells using the most transfection reagent 007 at the DNA and reagent ratio of 1:3.8.

The subsequent cotransfection studies showed that the levels of all protein subunits of MCM2-7 complex are regulated in KEAP1 dependent manner. As KEAP1 binds MCM3 with highest affinity, the possibility whether the observed KEAP1 dependent regulation of MCM2-7 subunits might be executed through interaction with MCM3 was tested, but the results did not provide a clear answer to this question. Nevertheless, the results from transfection conditions optimization and cotransfections experiments are useful for further investigation of KEAP1 dependent regulation of MCM2-7 subunits.

## KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Andreassi, M.G. (2003). Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* 543: 67–86.
- Aparicio, O.M., Weinstein, D.M., ja Bell, S.P. (1997). Components and Dynamics of DNA Replication Complexes in *S. cerevisiae*: Redistribution of MCM Proteins and Cdc45p during S Phase. *Cell* 91: 59–69.
- Arias, E.E., ja Walter, J.C. (2007). Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev.* 21: 497–518.
- Baird, L., ja Dinkova-Kostova, A.T. (2011). The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.* 85: 241–272.
- Balestrini, A., Cosentino, C., Errico, A., Garner, E., ja Costanzo, V. (2010). GEMC1 is a TopBP1-interacting protein required for chromosomal DNA replication. *Nat. Cell Biol.* 12: 484–491.
- Barry, E.R., McGeoch, A.T., Kelman, Z., ja Bell, S.D. (2007). Archaeal MCM has separable processivity, substrate choice and helicase domains. *Nucleic Acids Res.* 35: 988–998.
- Bell, S.P., ja Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 333–374.
- Bell, S.P., ja Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 357: 128–134.
- Blow, J.J., ja Gillespie, P.J. (2008). Replication licensing and cancer - a fatal entanglement? *Nat. Rev. Cancer* 8: 799–806.
- Bochman, M.L., ja Schwacha, A. (2008). The Mcm2-7 Complex Has In Vitro Helicase Activity. *Mol. Cell* 31: 287–293.
- Bochman, M.L., ja Schwacha, A. (2009). The Mcm complex: unwinding the mechanism of a replicative helicase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73: 652–683.
- Bochman, M.L., Bell, S.P., ja Schwacha, A. (2008). Subunit Organization of Mcm2-7 and the Unequal Role of Active Sites in ATP Hydrolysis and Viability. *Mol. Cell. Biol.* 28: 5865–5873.
- Chowdhury, A., Liu, G., Kemp, M., Chen, X., Katrangi, N., Myers, S., Ghosh, M., Yao, J., Gao, Y., Bubulya, P., *et al.* (2010). The DNA Unwinding Element Binding Protein DUE-B Interacts with Cdc45 in Preinitiation Complex Formation. *Mol. Cell. Biol.* 30: 1495–1507.
- Chuang, C.H., Wallace, M.D., Abratte, C., Southard, T., ja Schimenti, J.C. (2010). Incremental genetic perturbations to MCM2-7 expression and subcellular distribution reveal exquisite sensitivity of mice to DNA replication stress. *PLOS Genet.* 6: e1001110.

- Chuang, C.H., Yang, D., Bai, G., Freeland, A., Pruitt, S.C., ja Schimenti, J.C. (2012). Post-transcriptional homeostasis and regulation of MCM2-7 in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 40: 4914–4924.
- Costa, A., van Duinen, G., Medagli, B., Chong, J., Sakakibara, N., Kelman, Z., Nair, S.K., Patwardhan, A., ja Onesti, S. (2008). Cryo-electron microscopy reveals a novel DNA-binding site on the MCM helicase. *EMBO J.* 27: 2250–2258.
- Costa, A., Ilves, I., Tamberg, N., Petojevic, T., Nogales, E., Botchan, M.R., ja Berger, J.M. (2011). The structural basis for MCM2-7 helicase activation by GINS and Cdc45. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18: 471–477.
- Cullinan, S.B., Gordan, J.D., Jin, J., Harper, J.W., ja Diehl, J.A. (2004). The Keap1-BTB Protein Is an Adaptor That Bridges Nrf2 to a Cul3-Based E3 Ligase: Oxidative Stress Sensing by a Cul3-Keap1 Ligase. *Mol. Cell. Biol.* 24: 8477–8486.
- Dahmann, C., Diffley, J.F.X., ja Nasmyth, K.A. (1995). S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Curr. Biol.* 5: 1257–1269.
- Davey, M.J., Indiani, C., ja O'Donnell, M. (2003). Reconstitution of the Mcm2-7p Heterohexamer, Subunit Arrangement, and ATP Site Architecture. *J. Biol. Chem.* 278: 4491–4499.
- Diffley, J.F.X. (2004). Regulation of Early Events in Chromosome Replication. *Curr. Biol.* 14: R778–R786.
- Evrin, C., Clarke, P., Zech, J., Lurz, R., Sun, J., Uhle, S., Li, H., Stillman, B., ja Speck, C. (2009). A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 20240–20245.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R.G., Bartek, J., ja Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410: 842–847.
- Fletcher, R.J., Bishop, B.E., Leon, R.P., Sclafani, R.A., Ogata, C.M., ja Chen, X.S. (2003). The structure and function of MCM from archaeal *M. Thermoautotrophicum*. *Nat. Struct. Biol.* 10: 160–167.
- Frigola, J., Remus, D., Mehanna, A., ja Diffley, J.F.X. (2013). ATPase-dependent quality control of DNA replication origin licensing. *Nature* 495: 339–343.
- Golden, T.R., Hinerfeld, D.A., ja Melov, S. (2002). Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell* 1: 117–123.
- Gonzalez, M.A., Tachibana, K.K., Laskey, R.A., ja Coleman, N. (2005). Control of DNA

- replication and its potential clinical exploitation. *Nat. Rev. Cancer* 5: 135–141.
- Hast, B.E., Goldfarb, D., Mulvaney, K.M., Hast, M.A., Siesser, P.F., Yan, F., Hayes, D.N., ja Major, M.B. (2013). Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination. *Cancer Res.* 73: 2199–2210.
- Havens, C.G., ja Walter, J.C. (2011). Mechanism of CRL4Cdt2, a PCNA-dependent E3 ubiquitin ligase. *Genes Dev.* 25: 1568–1582.
- Heffernan, T.P., Unsal-Kacmaz, K., Heinloth, A.N., Simpson, D.A., Paules, R.S., Sancar, A., Cordeiro-Stone, M., ja Kaufmann, W.K. (2007). Cdc7-Dbf4 and the Human S Checkpoint Response to UVC. *J. Biol. Chem.* 282: 9458–9468.
- Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J.J., ja Botchan, M.R. (2010). Activation of the MCM2-7 Helicase by Association with Cdc45 and GINS Proteins. *Mol. Cell* 37: 247–258.
- Imlay, J.A. (2003). Pathways of Oxidative Damage. *Annu. Rev. Microbiol* 57: 395–418.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., ja Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13: 76–86.
- Iyer, L.M., Leipe, D.D., Koonin, E. V, ja Aravind, L. (2004). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J. Struct. Biol.* 146: 11–31.
- Jaramillo, M.C., ja Zhang, D.D. (2013). The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev.* 27: 2179–2191.
- Jenkinson, E.R., ja Chong, J.P.J. (2006). Minichromosome maintenance helicase activity is controlled by N- and C-terminal motifs and requires the ATPase domain helix-2 insert. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 7613–7618.
- Klemm, R.D., Austin, R.J., ja Bell, S.P. (1997). Coordinate Binding of ATP and Origin DNA Regulates the ATPase Activity of the Origin Recognition Complex. *Cell* 88: 493–502.
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., ja Yamamoto, M. (2004). Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 24: 7130–7139.
- Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., ja Dunphy, W.G. (2010). Treslin Collaborates with TopBP1 in Triggering the Initiation of DNA Replication. *Cell* 140: 349–359.
- Li, N., Zhai, Y., Zhang, Y., Li, W., Yang, M., Lei, J., Tye, B.-K., ja Gao, N. (2015). Structure of the eukaryotic MCM complex at 3.8 Å. *Nature* 524: 186–191.
- Li, X., Zhang, D., Hannink, M., ja Beamer, L.J. (2004). Crystal Structure of the Kelch Domain of Human Keap1. *J. Biol. Chem.* 279: 54750–54758.

- Lo, S.-C., Li, X., Henzl, M.T., Beamer, L.J., Hannink, M., Bloom, D., Dhakshinamoorthy, S., Jaiswal, A., Bomont, P., Cavalier, L., *et al.* (2006). Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J.* 25: 3605–3617.
- Lutzmann, M., ja Méchali, M. (2008). MCM9 Binds Cdt1 and Is Required for the Assembly of Prereplication Complexes. *Mol. Cell* 31: 190–200.
- Lygerou, Z., Nishitani, H., Nishimoto, T., ja Nurse, P. (2000). The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* 404: 625–628.
- Maiorano, D., Moreau, J., ja Méchali, M. (2000). XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature* 404: 622–625.
- Matsuno, K., Kumano, M., Kubota, Y., Hashimoto, Y., ja Takisawa, H. (2006). The N-Terminal Noncatalytic Region of *Xenopus* RecQ4 Is Required for Chromatin Binding of DNA Polymerase in the Initiation of DNA Replication. *Mol. Cell. Biol.* 26: 4843–4852.
- McGarry, T.J., ja Kirschner, M.W. (1998). Geminin, an Inhibitor of DNA Replication, Is Degraded during Mitosis. *Cell* 93: 1043–1053.
- McGeoch, A.T., Trakselis, M.A., Laskey, R.A., ja Bell, S.D. (2005). Organization of the archaeal MCM complex on DNA and implications for the helicase mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 756–762.
- McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., ja Hayes, J.D. (2004). Redox-regulated Turnover of Nrf2 Is Determined by at Least Two Separate Protein Domains, the Redox-sensitive Neh2 Degron and the Redox-insensitive Neh6 Degron. *J. Biol. Chem.* 279: 31556–31567.
- McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., ja Hayes, J.D. (2006). Dimerization of Substrate Adaptors Can Facilitate Cullin-mediated Ubiquitylation of Proteins by a “Tethering” Mechanism. *J. Biol. Chem.* 281: 24756–24768.
- Merrick, C.J., Jackson, D., ja Diffley, J.F.X. (2004). Visualization of Altered Replication Dynamics after DNA Damage in Human Cells. *J. Biol. Chem.* 279: 20067–20075.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* 420: 846–852.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., ja Koonin, E. V. (1999). AAA+: A Class of Chaperone-Like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes. *Genome Res.* 9: 27–43.
- Ogura, T., Tong, K.I., Mio, K., Maruyama, Y., Kurokawa, H., Sato, C., ja Yamamoto, M. (2010). Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 2842–2847.



- Pefani, D.-E., Dimaki, M., Spella, M., Karantzelis, N., Mitsiki, E., Kyrousi, C., Symeonidou, I.-E., Perrakis, A., Taraviras, S., ja Lygerou, Z. (2011). Idas, a Novel Phylogenetically Conserved Geminin-related Protein, Binds to Geminin and Is Required for Cell Cycle Progression. *J. Biol. Chem.* 286: 23234–23246.
- Randell, J.C.W., Bowers, J.L., Rodríguez, H.K., ja Bell, S.P. (2006). Sequential ATP Hydrolysis by Cdc6 and ORC Directs Loading of the Mcm2-7 Helicase. *Mol. Cell* 21: 29–39.
- Rao, A.V., ja Balachandran, B. (2002). Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Neurodegenerative Diseases. *Nutr. Neurosci.* 5: 291–309.
- Remus, D., ja Diffley, J.F. (2009). Eukaryotic DNA replication control: Lock and load, then fire. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21: 771–777.
- Remus, D., Beuron, F., Tolun, G., Griffith, J.D., Morris, E.P., ja Diffley, J.F.X. (2009). Concerted Loading of Mcm2–7 Double Hexamers around DNA during DNA Replication Origin Licensing. *Cell* 139: 719–730.
- Saito, R., Suzuki, T., Hiramoto, K., Asami, S., Naganuma, E., Suda, H., Iso, T., Yamamoto, H., Morita, M., Furusawa, Y., *et al.* (2016). Characterizations of Three Major Cysteine Sensors of Keap1 in Stress Response. *Mol. Cell. Biol.* 36: 271–284.
- Sakakibara, N., Kelman, L.M., ja Kelman, Z. (2009). Unwinding the structure and function of the archaeal MCM helicase. *Mol. Microbiol.* 72: 286–296.
- Sanchez-Pulido, L., Diffley, J.F.X., ja Ponting, C.P. (2010). Homology explains the functional similarities of Treslin/Ticrr and Sld3. *Curr. Biol.* 20: 509–510.
- Sangrithi, M.N., Bernal, J.A., Madine, M., Philpott, A., Lee, J., Dunphy, W.G., ja Venkitaraman, A.R. (2005). Initiation of DNA Replication Requires the RECQL4 Protein Mutated in Rothmund-Thomson Syndrome. *Cell* 121: 887–898.
- Sansam, C.L., Cruz, N.M., Danielian, P.S., Amsterdam, A., Lau, M.L., Hopkins, N., ja Lees, J.A. (2010). A vertebrate gene, ticrr, is an essential checkpoint and replication regulator. *Genes Dev.* 24: 183–194.
- Schimke, R.T., Sherwood, S.W., Hill, A.B., ja Johnstont, R.N. (1986). Overreplication and recombination of DNA in higher eukaryotes: Potential consequences and biological implications. *Genetics* 83: 2157–2161.
- Sclafani, R.A., ja Holzen, T.M. (2007). Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu. Rev. Genet.* 41: 237–280.
- Siddiqui, K., On, K.F., ja Diffley, J.F.X. (2013). Regulating DNA Replication in Eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5: a012930–a012930.

- Zipper, L.M., ja Mulcahy, R.T. (2002). The Keap1 BTB/POZ Dimerization Function Is Required to Sequester Nrf2 in Cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 277: 36544–36552.
- Takayama, Y., Kamimura, Y., Okawa, M., Muramatsu, S., Sugino, A., ja Araki, H. (2003). GINS, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Genes Dev.* 17: 1153–1165.
- Tong, K.I., Kobayashi, A., Katsuoka, F., ja Yamamoto, M. (2006a). Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: A hinge and latch mechanism. *Biol. Chem.* 387: 1311–1320.
- Tong, K.I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., ja Yamamoto, M. (2006b). Keap1 Recruits Neh2 through Binding to ETGE and DLG Motifs: Characterization of the Two-Site Molecular Recognition Model. *Mol. Cell. Biol.* 26: 2887–2900.
- Truong, L.N., ja Wu, X. (2011). Prevention of DNA re-replication in eukaryotic cells. *J. Mol. Cell Biol.* 3: 13–22.
- Tye, B. (1999). MCM proteins in DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 649–686.
- Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D.R., *et al.* (2003). Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat. Genet.* 35: 238–245.
- Yekezare, M., Gómez-González, B., ja Diffley, J.F.X. (2013). Controlling DNA replication origins in response to DNA damage - inhibit globally, activate locally. *J. Cell Sci.* 126: 1297–1306.

## **TÄNUAVALDUSED**

Täna oma lõputöö juhendajat Ivar Ilvest, kelle uurimisrühmas töötades on mul olnud võimalus tegeleda huvitava uurimisteedega ja saada selgeks mitmed laboritöös kasutatavad meetodid. Veel täna kõiki endisi ja praegusi labori kolleege, kes on mind selle peaaegu kahe aasta jooksul laboris abistanud ja kellega koos on olnud väga tore.

## LIHTLITSENTS

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Gerda Raja (sünnikuupäev: 07.10.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**Replikatiivse helikaasikompleksi MCM2-7 subühikute taseme reguleerimine oksüdatiivse stressi sensorvalk KEAP1 poolt**“, mille juhendaja on Ivar Ilves,
  - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 01.01.2018 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016